



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*

Discipline ou spécialité : *Systèmes microbiens et bioprocédés*

Présentée et soutenue par *Maud Babau*
Le 15 juillet 2015

Titre : *Croissance et accumulation lipidique de Rhodotorula glutinis (Rhodosporidium toruloides) sur glucose, xylose et glycérol : vers la valorisation des coproduits agricoles et industriels pour la production de lipides à usages énergétiques.*

JURY

Stéphane DELAUNAY	Professeur ENSAIA, Nancy	Rapporteur
Jack LEGRAND	Professeur CNRS, Directeur du GEPEA, Nantes	Rapporteur
Yohan ALLOUCHE	Chef de projet, Airbus	Examineur
Estelle GROUSSEAU	Maître de conférences, Montpellier	Examineur
Jean-Louis URIBELLAREA	Professeur INSA, Toulouse	Président du Jury
Carole MOLINA-JOUE	Professeur INSA, Toulouse	Directrice de thèse

Ecole doctorale : *SEVAB*

Unité de recherche : *Equipe Fermentation Advances and Microbial Engineering*

Directeur(s) de Thèse : *Carole Molina-Jouve, Professeur INSA*

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'INSA de Toulouse

Spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Filière : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

Présenté à

L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Par Maud Babau

**Croissance et accumulation lipidique de *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toruloides*)
sur glucose, xylose et glycérol : vers la valorisation des coproduits agricoles et industriels
pour la production de lipides à usages énergétiques.**

Date de soutenance : 15 juillet 2015, devant la commission d'examen :

Stéphane DELAUNAY	Professeur ENSAIA, Nancy	Rapporteur
Jack LEGRAND	Professeur CNRS, Directeur du GEPEA, Nantes	Rapporteur
Yohan ALLOUCHE	Chef de projet, Airbus	Examineur
Estelle GROUSSEAU	Maître de conférences, Montpellier	Examineur
Jean-Louis URIBELLAREA	Professeur INSA, Toulouse	Président du Jury
Carole MOLINA- JOUVE	Professeur INSA, Toulouse	Directrice de thèse

Thèse préparée à l'UMR-5504 et 792 d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés,
CNRS -INRA-INSA, du département de Génie biochimique de l'INSA de Toulouse.

Nom : Babau

Prénom : Maud

Titre : Croissance et production de lipides chez *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toruloides*) sur glucose, xylose et glycérol : vers la valorisation des coproduits agricoles et industriels pour la production de lipides à usages énergétiques.

Année : 2015

Lieu : INSA Toulouse

Résumé :

Rhodotorula glutinis (*Rhodosporidium toruloides*) est une levure oléagineuse dont les fortes capacités d'accumulation lipidique à partir de glucose comme source carbonée ont fait de la souche un modèle d'étude. La capacité de cette levure à utiliser le glycérol ou le xylose en simple ou co-substrat avec le glucose est toutefois encore peu explorée. De l'analyse des travaux antérieurs il a été possible de dégager les verrous scientifiques qui nécessitent une amélioration des connaissances du comportement physiologique de cette levure pour la conversion des substrats cités. Des stratégies expérimentales adaptées à la quantification rationnelle des dynamiques de *Rhodotorula glutinis* en conditions de croissance et accumulation lipidique à partir de xylose et de glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose ont été développées. Des résultats originaux ont été obtenus dont :

- la mise en évidence des potentialités de co-consommation des substrats xylose et glucose ou glycérol et glucose sans accumulation de substrat ni production de métabolites en conditions contrôlées des flux de substrats. Il a été possible de déterminer la vitesse spécifique maximale de consommation du carbone de la souche qui diminue lorsque la part de xylose ou glycérol augmente dans l'apport de carbone total.

- la quantification de la dynamique de croissance sur xylose et glycérol pur en terme de taux de croissance et de rendement : sur xylose $\mu_{\max} = 0.034 \text{ h}^{-1}$ et $R_{S/X} = 0.28 \text{ C}_{\text{molx}} \cdot \text{C}_{\text{molxylose}}^{-1}$; sur glycérol $\mu_{\max} = 0.04 \text{ h}^{-1}$ $R_{S/X} = 0.31 \text{ C}_{\text{molx}} \cdot \text{C}_{\text{molglycérol}}^{-1}$.

- la quantification des vitesses spécifiques et rendements de production de lipides à partir de xylose ou de glycérol en simple ou co-substrat avec du glucose : 20%xylose-80% glucose : $q_p = 0.065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.3 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 100% xylose : $q_p = 0.035065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.31 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 25% glycérol-75% glucose : $q_p = 0.07065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.25 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 100% glycérol : $q_p = 0.03065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.29 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$.

- L'impact de la nature des substrats sur le profil lipidique de *Rhodotorula glutinis* demeure léger : il apparaît que le xylose entraîne une surproduction de C16:0 et C18:3 et le glycérol favorise l'accumulation de C18:0.

Mots clés :

Rhodotorula glutinis, *Rhodosporidium toruloides*, levure, croissance, lipides, co-substrats, xylose, glycérol, limitation azote, fed-batch, bioprocédé, biocarburants aéronautiques.

Last name : Babau

First name : Maud

Title : Growth and lipid accumulation of the yeast *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toruloides*) from glucose, xylose and glycerol : towards agricultural and industrial byproduct utilization for lipid production for energy use.

Year : 2015

Place : INSA Toulouse

Abstract :

Rhodotorula glutinis (*Rhodosporidium toruloides*) is an oleaginous yeast. The micro-organism has demonstrated high lipid accumulation when utilizing glucose as a substrate, and has become a model for oil production. Glycerol and xylose are interesting as substrates for production of oil from renewable resources, but the capacity of *R. glutinis* to utilize glycerol and xylose as substrates has not been characterized well. Fermentation strategies were designed to quantify growth and lipid accumulation dynamics of *R. glutinis* when utilizing glycerol and xylose - either as pure substrates, or as co-substrates with glucose. Several original results have been found, including:

- Co-consumption of xylose or glycerol along with glucose was observed, without carbon substrate accumulation or byproduct formation, when the carbon feed rate was carefully controlled. The specific carbon consumption rate decreases when the proportion of the second substrate (glycerol or xylose) increases in the feed, relative to glucose.

- Growth capacities were characterized on pure xylose and pure glycerol in terms of growth rate and carbon yields: on xylose $\mu_{\max} = 0.034 \text{ h}^{-1}$ and $R_{S/X} = 0.28 \text{ C}_{\text{molx}} \cdot \text{C}_{\text{molxylose}}^{-1}$; on glycerol $\mu_{\max} = 0.04 \text{ h}^{-1}$ $R_{S/X} = 0.31 \text{ C}_{\text{molx}} \cdot \text{C}_{\text{molglycerol}}^{-1}$.

- specific production rate of lipid production and substrate to product carbon conversion yields from xylose or glycerol as single or cosubstrate with glucose were determined: 20%xylose-80%glucose : $q_p = 0.065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.3 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$ 100%xylose : $q_p = 0.035065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.31 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 25% glycerol-75%glucose : $q_p = 0.07065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.25 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 100% glycerol : $q_p = 0.03065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}}^{-1}$, $R_{S/P} = 0.29 \text{ C}_{\text{moleTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molesubstrat}}^{-1}$.

- Substrate diversification slightly impacts *Rhodotorula glutinis*'s lipid profile: xylose leads to an overproduction of C16:0 and C18:3 and glycerol increases C18:0 accumulation.

Key words: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, yeast, growth, lipid accumulation, xylose, glycerol, nitrogen limitation, fed-batch, bioprocess, biofuel.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, je tiens donc à remercier Nicholas Lindlay, directeur du LISBP pour m'avoir accueillie dans son excellent laboratoire.

Je tiens à remercier les rapporteurs Jack Legrand et Stéphane Delaunay, pour avoir accepté d'évaluer mon travail, malgré le court délai imparti ! Je remercie sincèrement l'ensemble des membres de mon jury de thèse : Stéphane Delaunay, Jack Legrand, Yohan Allouche, Estelle Grousseau, Carole Molina-Jouve et Jean-Louis Uribe Larrea qui ont fait de ma soutenance un moment agréable avec une discussion scientifique intéressante.

Il s'est écoulé un peu plus de cinq ans et demi depuis le jour où j'ai postulé pour l'offre de thèse. Je me souviens très précisément de mon enthousiasme à la lecture de la description du projet et je me souviens avoir pensé que ce serait cette thèse ou aucune autre : la spécialité en fermentation au sein d'une équipe reconnue, une application biocarburant originale et une collaboration industrielle avec Airbus, tous les éléments étaient réunis pour me permettre de donner à ma carrière professionnelle la direction que je souhaitais lui donner, avec à la clé un doctorat. Je remercie donc Yohan Allouche, chef de projets recherche carburant aéronautique et assistant du chef du centre propulsion à Airbus pour m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce projet. Yohan, ce fut un honneur de travailler dans ton sillage et de partager ton énergie, ton enthousiasme et ton ambition pour développer les biocarburants aéronautiques. Je te remercie très sincèrement pour notre collaboration qui m'a beaucoup apporté.

Je remercie tout particulièrement Carole Molina-Jouve, Professeur INSA et responsable de l'équipe FAME, pour l'encadrement de ce travail. Bien plus qu'une directrice de thèse, c'est avec une professeure, chef d'équipe, coordinatrice de ProBio3, et femme d'exception (sans référence aucune à une mauvaise série télé !) que j'ai eu l'occasion de travailler ! Merci Carole pour votre soutien au quotidien, pour m'avoir permis de communiquer sur mes travaux et pour tout ce que j'ai appris grâce à vous !

Je remercie Jean-Louis Uribe Larrea, Professeur INSA, pour son encadrement scientifique. En véritable « puits de science », il m'a permis de développer mes compétences en fermentation, dans un très grand souci du détail. Depuis cette collaboration, je fais aussi attention au vocabulaire que j'emploie : j'ai ainsi appris qu'on ne pouvait pas interchanger les mots complexes et compliqués, l'un qualifiant un phénomène modélisable, l'autre non. Une chose

est sûre, une collaboration « uribelarrenne » ça vous forge l'esprit (et le caractère) ! Merci pour cet immense partage de connaissances !

Ces travaux ont été menés dans l'équipe FAME (Fermentation Advances and Microbial Engineering) du LISBP, je remercie donc l'ensemble des membres permanents et non-permanents qui m'ont accompagnée au cours de la réalisation de ces travaux. Leur contribution de près ou de loin a permis le bon déroulement de cette thèse. Plus généralement, un grand merci à tous pour la qualité des échanges scientifiques et des remarques constructives ! Nos réunions-débats passionnés me manquent ! Plus particulièrement, je remercie Luc et Xavier, qui m'ont « fait rentrer » dans l'équipe en me recrutant pour mon stage de fin d'études, je remercie Eric pour le support technique, pour sa grande disponibilité et pour sa gentillesse. Avec beaucoup d'émotion je remercie Stéphane et Nathalie pour leur soutien et leur bienveillance. Et aussi pour leur humour ! Enfin, surtout Nathalie... ☺ Merci à Julien Cescut pour le « coaching » intense sur les lipides, et pour la complicité et l'amitié partagées. Je remercie l'ensemble des doctorants et post-doctorants avec qui j'ai eu l'immense plaisir de travailler : Claudia, Emilie, Jillian, Julien P., Sandra, Julie B., Estelle, Jan, Lannig, Julie M., Damien, Sandra, Léa, Céline, Sandy, Yannick merci pour tous les bons moments partagés et pour le soutien dans les moments moins bons. Outre la qualité de nos échanges sur nos travaux respectifs, je garde aussi un excellent souvenir de toutes nos expériences de communication au grand public. Les nuits des chercheurs, journées de la science, salon de l'agriculture ont été des expériences de confrontation au grand public très enrichissantes et j'ai été ravie de les vivre avec vous ! Je garde aussi un excellent souvenir des moments de détente partagés ☺

Bien évidemment je remercie Claude Maranges, directeur de l'école doctorale SEVAB, pour son accompagnement tout au long de ce travail. Les formations dispensées par l'école doctorale sont d'une très grande qualité. En particulier, je garde un souvenir très formateur de la conférence débat au muséum et des doctoriales. Merci Claude de te démenner pour les étudiants, d'avoir toujours le sourire et de toujours trouver des solutions ! Les étudiants de l'INSA et de SEVAB ont de la chance de t'avoir, et ils le savent !

La réalisation d'une thèse dépasse le simple cadre professionnel pour déborder largement sur la vie privée. Je remercie mes copines toulousaines, pour le soutien à toute épreuve et surtout pour le concentré de bons moments passés ensemble : Léa, Laura, Tamara et Julia, je souris rien que de penser à vous ☺ Vous me manquez ! Je remercie aussi mes copains esiliens pour nos week-ends décompression (c'est le moins qu'on puisse dire !). Un énorme merci à Sandra, pour m'avoir prêté sa capricieuse Prudence ! Les moments passés à cheval ont été une vraie bouffée d'oxygène !

L'impression de ce manuscrit met fin à 10 années d'études supérieures. Je remercie mes grands parents : Marlette, Papy Mo, Papinou et Maminou pour m'avoir donné le goût du travail, pour m'avoir enseigné la persévérance et l'autonomie, pour avoir insisté sur la nécessité de « bien travailler à l'école » pour pouvoir ensuite « faire ce que je veux de ma vie ». Ces petites graines que vous avez plantées dans ma tête ont bien poussé et m'ont accompagnée tout au long de ces années d'efforts. Cet ultime diplôme, je vous le dédis, à vous quatre.

Je remercie ma grande sœur, Adeline, pour m'avoir toujours épaulée et soutenue au cours de ces années d'étude. Ade, tes encouragements dans les moments difficiles m'ont été très précieux ! Merci d'avoir été là pour moi ! Tu es la meilleure GRANDE sœur ! Merci à Benoît (sinon il va être jaloux !) et aux zouzoux : Baptiste, Clément et Léo, vous êtes mes rayons de soleil!

Evidemment, tout ça n'aurait pas été possible sans le soutien de mes parents, qui ont fait de mes études une priorité et m'ont toujours donné les moyens de faire ce que je voulais pour atteindre mes objectifs. Papa et maman, merci de m'avoir suivi et accompagnée dans mes choix, même quand c'était difficile, merci de m'avoir guidée quand j'en avais besoin et d'avoir toujours été là avec moi, que ce soit pour encaisser les coups ou pour fêter les réussites, vous avez toujours assuré. Vous êtes des parents exceptionnels! Merci aussi pour tout le soutien logistique, les recherches d'appartement et les déménagements au quatre coins de la France. Au final, on en garde des bons souvenirs !

Enfin, je remercie celui qui m'a porté et supporté durant la longue période de rédaction, en parallèle du travail, et qui m'a donné la force pour tenir la distance : Nick cette thèse est la tienne... à 50% !

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. »
Marie Curie

Table des matières

Partie 1 : Introduction et contexte de l'étude	1
1. Le transport aérien, les émissions de dioxyde de carbone, la consommation de carburant : bilan actuel et perspectives.....	3
2. Les enjeux du développement de carburant alternatif pour l'aviation	4
3. Les efforts de l'industrie aéronautique	5
4. Les contraintes des carburants des transports aériens	6
5. Les solutions alternatives aux carburants fossiles	6
6. L'enjeu des lipides microbiens.....	8
Conclusion	8
Partie 2 : Etat de l'art.....	11
1. Les micro-organismes oléagineux.....	13
1.1. Définition et caractéristiques.....	13
1.2. Principaux micro-organismes oléagineux.	13
1.3. <i>Rhodotorula glutinis</i> , une levure oléagineuse d'intérêt.....	16
1.3.1. Classification.....	16
1.3.2. Morphologie.....	16
1.3.3. Diversité du potentiel de la souche et utilisation industrielle.....	16
1.4. Nature des lipides microbiens accumulés par <i>Rhodotorula glutinis</i>	23
1.4.1. Les triacylglycérols.	23
1.4.2. Les caroténoïdes.....	26
2. Métabolisme d'accumulation de substances carbonées de réserves de la levure oléagineuse <i>Rhodotorula glutinis</i>	26
2.1. L'accumulation de lipides.....	26
2.1.1. Biochimie et stœchiométrie de la synthèse des acides gras et des triglycérides.....	26
2.1.1.1. Synthèse d'acétyl Co-A.....	27
2.1.1.2. Synthèse du malonyl-CoA via l'acétyl-CoA carboxylase.....	27
2.1.1.3. Synthèse et élongation des chaînes d'acides gras.....	28
2.1.1.4. La désaturation.....	32
2.1.1.5. Synthèse des triacylglycérols.	33
2.1.2. Le mécanisme de l'accumulation lipidique	34
2.1.2.1. L'induction du métabolisme d'accumulation	34
2.1.2.2. Facteurs influençant l'accumulation lipidique.	36
2.1.3. Le stockage des substances lipidiques.....	41
2.1.3.1. Nature et composition des gouttelettes lipidiques	41
2.1.3.2. Mécanisme de formation des gouttelettes lipidiques.....	42
2.2. L'accumulation de polysaccharides	43
2.3. Voie de synthèse des caroténoïdes.....	45

3. Catabolisme des substances carbonées de la levure oléagineuse <i>Rhodotorula glutinis</i>	46
3.1. Le métabolisme central.	46
3.1.1. La glycolyse	46
3.1.2. Le pyruvate, carrefour métabolique.	47
3.1.3. Le cycle de Krebs.....	48
3.1.4. La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative.	49
3.2. Le catabolisme du xylose.	51
3.2.1. Transport du xylose.....	51
3.2.2. Premières étapes du métabolisme du xylose.	51
3.2.3. La voie des pentoses phosphate.	53
3.3. Le catabolisme du glycérol.	54
3.3.1. L'entrée du glycérol dans la cellule.	54
3.3.2. Les voies métaboliques de consommation du glycérol.	55
3.4. Le catabolisme des acides gras : la beta-oxydation.	56
3.4.1. Activation des acides gras	56
3.4.2. Dégradation des acides gras	56
4. Demande anabolique de la souche <i>Rhodotorula glutinis</i>	59
4.1. Composition macro-moléculaire	59
4.2. Pouvoir réducteur, accumulation de lipides et substrats carbonés.	59
5. Performances de croissance et d'accumulation lipidique de la souche <i>Rhodotorula glutinis</i> à partir de diverses sources carbonées.	60
5.1. Potentialités de croissance.....	60
5.1.1. A partir du glucose comme source carbonée.....	60
5.1.2. A partir du xylose en simple ou co-substrat avec le glucose	61
5.1.3. A partir du glycérol en simple ou co-substrat avec le glucose	62
5.2. Bioprocédés et potentialités d'accumulation lipidique.....	63
5.2.1. Performances d'accumulation à partir du glucose comme source carbonée.	63
5.2.2. A partir du xylose comme source carbonée.	64
5.2.3. A partir du glycérol comme source carbonée.....	66
6. Conclusions	68
Partie 3 : Matériel et méthodes.....	73
1. Souche et milieux de culture	75
1.1. Souche étudiée	75
1.2. Milieux de culture	75
1.2.1. Milieu de conservation.....	75
1.2.2. Milieu de réveil de la souche.....	75
1.2.3. Milieu salin initial	76
1.2.4. Sels d'alimentations	76
1.2.5. Solution concentrée de substrats, vitamines et régulation de pH	78

2. Le fermenteur et le logiciel de commande et d'acquisition	79
2.1. Le réacteur instrumenté	79
2.1.1. Le fermenteur	79
2.1.2. L'instrumentation	80
2.1.3. Les actionneurs	80
2.1.4. Les alimentations	81
2.1.5. Les gaz	81
2.2. Acquisitions en ligne et logiciel de commande	81
2.2.1. Description	81
2.2.2. Calculs des consignes d'alimentation	84
2.2.2.1. Calculs des consignes d'alimentations en conditions de croissance	84
2.2.2.2. Calculs des consignes d'alimentations spécifiques aux conditions d'accumulation lipidique	87
3. Mise en œuvre des expérimentations	88
3.1. Mise en œuvre des fermentations	88
3.1.1. Préparation de l'expérimentation	88
3.1.2. Phases de précultures	88
3.1.3. Cultures : mise en œuvre et stratégie de conduite.	89
4. Méthodes analytiques	89
4.1. Suivi de la biomasse totale et caractérisation de la croissance	89
4.1.1. Détermination de la biomasse catalytique	89
4.1.2. Mesure de la densité optique	89
4.1.3. Réalisation de masses sèches	90
4.1.4. Microscopie.....	90
4.2. Analyse des substrats et métabolites extracellulaires par HPLC	90
4.3. Analyse des métabolites intracellulaires	91
4.3.1. Extraction et analyse des lipides	91
4.3.1.1. Préparation des échantillons	92
4.3.1.2. Extraction des lipides	92
4.3.1.3. Purification	93
4.3.1.4. Evaporation	93
4.3.1.5. Analyse des lipides extraits	93
4.3.2. Dosages des sucres totaux	95
4.4. Analyses CHONPS	96
4.5. Calcul de la consommation d'azote	96
5. Traitement des résultats.....	96
5.1. Analyse des Gaz de culture	96
5.1.1. Bilan pour un composé A du gaz	97
5.1.2. Azote	98
5.1.3. Oxygène	98

5.1.4. Dioxyde de carbone.....	100
5.2. Variable volume	102
5.3. Vitesses spécifiques, rendement et coefficient respiratoire.....	105
5.4. Bilans élémentaires	106
5.4.1. Bilan carbone	106
5.4.2. Bilan redox.....	106
6. Le descripteur métabolique	107
6.1. Description générale.....	107
6.2. L'anabolisme.....	107
6.3. Le catabolisme et la production	111
6.4. Résolution : utilisation comme simulateur	112
Partie 4 : Résultats	115
Chapitre I : Devenir du carbone en conditions de croissance à partir de xylose et glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose.....	117
1. Etude prédictive des flux de carbone intracellulaires par modélisation métabolique	117
1.1. Composition de la biomasse.....	117
1.2. Modélisation du métabolisme de croissance via les flux de carbone intracellulaires.....	118
Conclusion.	122
2. Etude comparative de l'assimilation par <i>Rhodotorula glutinis</i> du xylose et du glycérol en simples ou co-substrats avec le glucose en condition de croissance. Publication :	124
3. Influence du substrat carboné sur la composition macromoléculaire de <i>R. glutinis</i>	141
Conclusion.....	146
Chapitre 2 : Répartition du carbone à partir de xylose ou de glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose en condition de limitation azote par la levure <i>Rhodotorula glutinis</i>	155
1. Conduite de culture pour l'accumulation de lipides par la souche d'intérêt en co-substrats.	155
1.1. Etude expérimentale : le mode de culture	155
1.2. Limitation nutritionnelle : l'azote et le carbone	156
1. Capacité d'accumulation de macromolécules à partir de diverses sources carbonées	157
1.1. Résultats expérimentaux	157
1.1.1. A partir de glucose et de xylose en simple ou co-substrats	157
1.1.2. A partir de glucose et de glycérol en simple ou co-substrats	163
1.2. Problématique de la composition de la biomasse catalytique et réconciliation	168
1.2.1. Définition de la biomasse catalytique.	168
1.2.2. Problématique	168
1.2.3. Approche de réconciliation	169
1.2.3.1. Composition de la biomasse catalytique en condition de croissance	169

1.2.3.2. Calcul de la composition de biomasse catalytique et des pools macromoléculaires en condition d'accumulation de substances de réserves	171
1.3. Résolution : exemple avec le glucose et le xylose comme substrats	172
1.3.1.1. Réconciliation : résultat avec le glucose et le glycérol comme substrats	176
2. Analyses cinétiques	177
3. Analyse stœchiométrique	181
4. Effet de la diversification en substrats sur le profil en acides gras	183
Conclusion.....	185
Partie 5 : Conclusion générale et perspectives	192
Annexes	200
Abréviations	206
Références bibliographiques	210

Table des figures

Figure 1: Evolution du prix du baril de Brent en US dollar.	4
Figure 2: Feuille de route pour la réduction des émissions.	5
Figure 3 : Réaction de formation d'un triacylglycérol.	23
Figure 4 : Molécules de carotènes (a) β -carotène et b) torulène) et de xanthophylles (c) astaxanthin and d) canthaxanthine)	26
Figure 5 : Synthèse de l'acétyl-CoA, production de pouvoir réducteur et cycle citrate/malate.	27
Figure 6 : Cycle d'élongation d'une chaîne d'acide gras.	30
Figure 7: Schéma représentant le système de désaturation aérobie et localisation de la cis-élimination des deux atomes d'hydrogène sur la chaîne d'acide stéarique.	32
Figure 8: voies de synthèse possibles des acides gras à longue chaîne et polyinsaturés chez la levure.	33
Figure 9 : Voie de synthèse des triacylglycérols, ou voie de Kennedy, chez <i>Rhodospiridium toruloïdes</i>	34
Figure 10 : Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses.	35
Figure 11 : Photographie de <i>Rhodotorula glutinis</i> au microscope optique	41
Figure 12 : Rôle des sous-unités de la glycéról-3-phosphate-acyltransférase, en fonction de l'environnement, dans la formation des particules lipidiques.....	43
Figure 13: Voie Embden-Meyerhof-Parnas chez la levure.	47
Figure 14 : Pyruvate bypass.	48
Figure 15: Le cycle de Krebs.	49
Figure 16 : La phosphorylation oxydative	50
Figure 17 : Etapes de transformations du xylose au xylulose chez <i>Rhodotorula glutinis</i>	51
Figure 18: Réactions impliquées dans la voie des pentoses-phosphate.....	54
Figure 19: Les différents transporteurs du glycéról identifiés chez la levure.....	55
Figure 20 : Catabolisme du glycéról	56
Figure 21 : Hélice de Lynen.....	57
Figure 22: Photographie du montage expérimental.....	79
Figure 23: Modes de consigne des pompes péristaltiques disponibles grâce au programme de gestion de l'alimentation du réacteur.	83
Figure 24: Schéma du système réacteur illustrant l'entrée et la sortie des gaz associées aux variables utilisées pour le calcul des bilans gazeux.	97
Figure 25 : Flux métaboliques de <i>Rhodotorula glutinis</i>	121
Figure 26: Evolution du coefficient respiratoire au cours du temps lors de la culture de <i>R. glutinis</i> en mode fed-batch avec le glucose and xylose comme substrat, sur milieu minéral, à 30 °C, pH 5.5.....	144
Figure 27 : Concentrations résiduelles en sucres et concentration en xylitol au cours du temps lors de la culture de <i>R. glutinis</i> en mode fed-batch avec le glucose and xylose comme substrat, sur milieu minéral, à 30 °C, pH 5.5.	144
Figure 28 : Teneurs massique en polysaccharides et lipides totaux lors de la culture de <i>R. glutinis</i> en mode fed-batch avec le glucose and xylose comme substrat, sur milieu minéral, à 30 °C, pH 5.5.....	145
Figure 29 : La navette mitochondriale citrate-pyruvate	150

Figure 30 : La navette glycérol-phosphate, entre le cytosol et la membrane mitochondriale.	151
Figure 31: Régénération de pouvoir réducteur et synthèse d'ATP dans la chaîne respiratoire.	151
Figure 32 : la navette mitochondriale malate-aspartate.....	152
Figure 33 : Evolution de la concentration en biomasse totale, du ratio azote sur carbone et du ratio de l'apport en substrats carboné lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	158
Figure 34 : Evolution du K_{La} , du coefficient respiratoire et du ratio en substrats lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	159
Figure 35 : Concentrations en substrats résiduels et en xylitol dans le surnagent lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	160
Figure 36 : Evolution des pools macromoléculaires lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.....	162
Figure 37 : Evolution de la concentration en biomasse, du ratio azote sur carbone et du ratio de l'apport en substrats carboné lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.....	164
Figure 38 : Evolution du K_{La} , du coefficient respiratoire et du ratio en substrats lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.....	165
Figure 39 : Evolution des pools macromoléculaires a) lipides intracellulaires totaux b) polysaccharides totaux, lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.....	167
Figure 40 : Accumulation des éléments carbone, oxygène, hydrogène et azote au cours d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	173
Figure 41 : Evolution des pools macromoléculaires durant la phase d'accumulation de réserves lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	173
Figure 42 : Résultats de la réconciliation a) de la biomasse, b) des lipides totaux, c) des polysaccharides lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	176
Figure 43 : Résultats de la réconciliation a) de la biomasse, b) des lipides totaux et des polysaccharides lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.....	177
Figure 44 : Vitesses spécifiques de consommation des substrats lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	178
Figure 45 : Vitesses spécifiques de consommation des substrats lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.	179
Figure 46 : Taux de croissance et vitesses spécifiques de production de TAG lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	180
Figure 47 : Taux de croissance et vitesses spécifiques de production de TAG lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.....	180

Figure 48 : Profils lipidiques en acides gras totaux obtenus à partir de l'utilisation de différents substrats carbonés lors de cultures de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, limitation azote.	184
Figure 49: Evolution de la vitesse spécifique réelle d'accumulation de lipides en fonction du taux spécifique de croissance réel lors d'une culture de <i>R. glutinis</i> à 30°C, pH 5.5 avec le glucose comme substrat (Cescut, 2009)	188
Figure 50 : Biomasse totale, signal de la sonde biomasse et ratios en substrats lors de cultures de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, limitation azote, substrats glucose et xylose.	189
Figure 51 : Corrélation existante entre la biomasse et le signal de la sonde biomasse issues fermentation en mode fed-batch de <i>Rhodotorula glutinis</i> à partir de glucose et glycérol comme substrats a) biomasse totale en condition de croissance, b) biomasse catalytique après mise en place de la limitation azote.	189

Table des tableaux

Tableau 1: Principales spécifications du jet fuel	6
Tableau 2 : Les alternatives au kérosène fossile issu du pétrole Jet A/Jet A1	7
Tableau 3: Teneur lipidique maximale des principaux micro-organismes oléagineux.	15
Tableau 4 : Principaux brevets mettant en œuvre la souche oléagineuse <i>Rhodotorula glutinis</i>	18
Tableau 5 : Composition en acides gras totaux des lipides accumulés chez les principaux micro-organismes lipogènes (T : traces) comparées aux principales huiles végétales.....	25
Tableau 6: Performance d'accumulation lipidique (teneur en lipides et rendement) suivant différentes limitations nutritionnelles chez <i>R. glutinis</i> (Granger, 1992).	37
Tableau 7: Valeurs moyennes du taux spécifique de croissance et du rendement de conversion du glucose en biomasse observables avec <i>R. glutinis</i> avec différentes concentrations en oxygène dissous en réacteur agité glucose initial à 50g.L ⁻¹ , T : 30°C, pH 5.5 (Granger, 1992).	38
Tableau 8 : Influence du pH sur les vitesses spécifiques de synthèse des AG et sur le rendement de conversion du glucose en AG en réacteur agité glucose initial à 50g.L ⁻¹ , T : 30°C, pH 5.5 (Granger, 1992)	39
Tableau 9 : Profil en acides gras et teneur en ergostérol de la souche <i>Rhodotorula glutinis</i> pour différents pH (Johnson <i>et al.</i> , 1992).....	39
Tableau 10 : Influence du pH sur les vitesses spécifiques de synthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) et sur le rendement de conversion du glucose en AGPI (Granger, 1992).	39
Tableau 11 : Influence du pH sur les vitesses spécifiques de synthèse des AAL et sur le rendement de conversion du glucose en AAL (Granger, 1992).	40
Tableau 12 : Principales protéines des particules lipidiques et gènes les codant identifiés chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Athenstaedt <i>et al.</i> , 1999)	42
Tableau 13 : Composition macro-moléculaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivée sur différents substrats	59
Tableau 14 : Performances de production lipidique de <i>R. glutinis</i> à partir de glucose.....	63
Tableau 15 : Profil des acides gras totaux accumulés par <i>R. glutinis</i> en fin de phase d'accumulation lors d'une culture sur glucose en mode fed-batch, 30°C, pH 5.5 (Cescut, 2010).....	64
Tableau 16 : Principaux résultats de production lipidique à partir de xylose (Wiebe <i>et al.</i> , 2012.).....	65
Tableau 17. Principaux résultats de production lipidique de <i>Rhodotorula glutinis</i> à partir de glycérol.....	67
Tableau 18 : Profil lipidique de <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivée sur glycérol pur (Saenge <i>et al.</i> , 2010).	68
Tableau 19 : Variables biologiques obtenues lors de la culture de <i>Y. lipolytica</i> (WT) à 28°C, à pH 5.5 avec le glucose comme unique substrat et en co-substrat glucose/glycérol. (Cescut, 2009).	68
Tableau 20 : Composition du milieu YPD.	75
Tableau 21 : Composition du milieu salin.....	76
Tableau 22 : Composition des sels d'alimentation utilisés pour les expérimentations en conditions de croissance.	77
Tableau 23 : Composition des sels d'alimentation utilisés pour les expérimentations en conditions d'accumulation lipidique.	77
Tableau 24 : Concentration des substrats d'alimentation.	78
Tableau 25 : Composition de la solution concentrée de vitamines.	78
Tableau 26: Mesures en ligne avec leur mode de supervision et la précision des mesures.	82

Tableau 27 : Liste des variables estimées en ligne et leur unité.....	83
Tableau 28: Phases de précultures	88
Tableau 29 : Caractéristiques de l'HPLC Waters.....	91
Tableau 30 : Caractéristiques de la colonne 87 H Sigma	91
Tableau 31 : Conditions d'analyses	91
Tableau 32 : Cycles mis en œuvre lors de l'extraction par ASE.....	92
Tableau 33 : Paramètres de l'ASE pour l'extraction des lipides	93
Tableau 34: Conditions opératoires de la caractérisation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.	94
Tableau 35 : Gradient de température du four mis en œuvre lors de l'analyse par GC-FID des acides gras totaux.	95
Tableau 36 : Macromolécules intégrées au descripteur métabolique	108
Tableau 37 : Exemple de réaction de polymérisation détaillant la synthèse d'une macromolécule.....	108
Tableau 38 : Exemple de réaction de synthèse d'un monomère.	108
Tableau 39 : Liste des précurseurs	109
Tableau 40 : Composition de la biomasse utilisée dans le descripteur.....	111
Tableau 41 : Liste des intermédiaires.....	112
Tableau 42 : Composition élémentaire de <i>Rhodotorula glutinis</i>	117
Tableau 43 : Composition macromoléculaire de la biomasse.	118
Tableau 44 : Scénarios métaboliques envisagés de co-consommation du glucose et de glycérol.....	122
Tableau 45 : Scénarios métaboliques envisagés de co-consommation du glucose et du xylose.	122
Tableau 46: Degré de réduction des substrats carbonés utilisés lors des fermentations mises en œuvre et des TAG, principal produit.....	143
Tableau 47 : Synthèse des effets de l'utilisation du xylose ou du glycérol en simple ou co-subsstrats avec le glucose, sur le métabolisme de la souche <i>Rhodotorula glutinis</i>	147
Tableau 48: Degré de réduction des substrats carbonés utilisés lors des fermentations mises en œuvre et des TAG, principal produit de <i>Rhodotorula glutinis</i>	160
Tableau 49 : Composition élémentaire de la biomasse catalytique d'après les analyses élémentaires réalisées sur 28 échantillons de fermentation représentatifs de l'ensemble de l'étude.	169
Tableau 50 : Composition élémentaire de la biomasse catalytique après sélection des données.	169
Tableau 51 : Teneur en macromolécules de la biomasse catalytique correspondant à la composition élémentaire présentée dans le Tableau 50, d'après l'outil de modélisation métabolique.	170
Tableau 52 : Vecteur molaire utilisé pour le calcul de l'accumulation des éléments E_{mes}	172
Tableau 53 : Composition des triglycérides accumulés par <i>Rhodotorula glutinis</i> (Cescut, 2009).....	173
Tableau 54 : Moyenne de la composition des TAG accumulés par <i>Rhodotorula glutinis</i>	174
Tableau 55 : Matrice élémentaire prise pour l'estimation des variables.	174
Tableau 56 : Matrice élémentaire inverse prise pour l'estimation des variables.....	174
Tableau 57 : Composition de la biomasse catalytique issue du calcul de réconciliation.	175
Tableau 59 : Rendements carbone lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.	182

Tableau 60 : Rendements carbone lors d'une culture de <i>Rhodotorula glutinis</i> , mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.	183
Tableau 61 : Synthèse des effets de l'utilisation du xylose ou du glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose, sur le métabolisme de la souche <i>Rhodotorula glutinis</i>	186

Partie 1 : Introduction et contexte de l'étude

La recherche de molécules produites à partir de matières premières durables et alternatives aux ressources fossiles à usages carburants pour l'industrie du transport aérien est un défi majeur. Les enjeux sont nombreux : ils consistent à accroître l'indépendance énergétique de la France et de l'Europe, sécuriser les approvisionnements, réduire les impacts environnementaux du transport aérien et conforter la compétitivité internationale des industries de l'aéronautique. Plusieurs solutions sont aujourd'hui envisagées parmi lesquelles l'utilisation, après hydrotraitement des lipides levuriens qui se positionnent comme une alternative prometteuse aux énergies fossiles.

1. Le transport aérien, les émissions de dioxyde de carbone, la consommation de carburant : bilan actuel et perspectives.

En 2013, la flotte mondiale de l'aviation civile comportait 25 310 avions qui ont garanti le transport de près de 3 milliards de passagers et 40 000 000 tonnes de fret. En conséquence, le secteur aéronautique consomme environ 200 millions de tonnes de jet fuel par an, ce qui correspondait en 2010 à environ 5 % de la consommation mondiale de pétrole [1 ; 2]. Parallèlement, le marché ne cesse de se développer, principalement en raison de la forte croissance économique des pays émergents. L'intensification de la demande correspond à une augmentation record de 5 à 6% du nombre de passagers par kilomètre en 2013. Ainsi, cette même année, plus de 31.6 millions de vols ont été programmés pour l'aviation civile, ce qui représente un accroissement de 2% par rapport à 2012. Par ailleurs, 1400 nouveaux avions ont été mis en service en 2013, d'une taille moyenne supérieure aux appareils remplacés, augmentant de 5% le nombre de sièges qui se chiffre alors à 3.4 millions [2]. L'accroissement de la quantité annuelle de kérosène consommé est de 1 à 2 % et pourrait même atteindre 3 % à l'horizon 2050 [1 ; 3].

Le secteur aéronautique est aujourd'hui responsable de 2% à 3% des émissions anthropogéniques mondiales de dioxyde de carbone, ce qui représentait 677 millions de tonnes émises en 2008 [4]. Les biocarburants émettent également du dioxyde de carbone, mais au cours de leur cycle de vie, ils pourraient permettre de réduire jusqu'à 80% des émissions de carbone par rapport à un carburant classique d'origine fossile. Par ailleurs, la distribution de biojetfuels dans 190 aéroports mondiaux suffirait à approvisionner 80% des vols [2].

Directement concerné par l'adéquation entre la demande et la production des ressources pétrolières, le transport aérien est fortement exposé à la fluctuation du prix du baril de pétrole, qui est passé de 70\$ en moyenne en 2009 à 124.5\$ le baril de Brent en 2013 (Figure 1). Les estimations faites pour 2014 prédisaient un tarif similaire voire à la hausse, alors que la chute du cours du pétrole observée en fin d'année (à partir de septembre 2014) a abaissé la moyenne annuelle du prix du baril de Brent à 99 dollars [5].

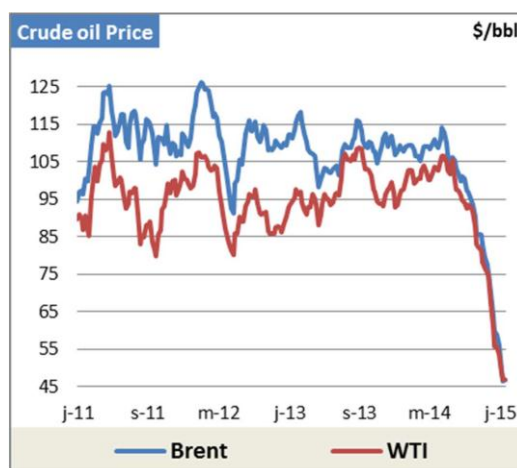


Figure 1: Evolution du prix du baril de Brent en US dollar [6].

En conséquence, les dépenses des compagnies aériennes associées au carburant sont considérables : en 2013 le coût du carburant représentait 31% des dépenses directes de fonctionnement des compagnies aériennes, il s'élevait à 33% en 2012.

2. Les enjeux du développement de carburant alternatif pour l'aviation

Dans ce contexte, le développement de biocarburants pour l'aéronautique, désignés par biokérosène ou bio jet fuel, revêt des enjeux importants. De nouvelles matières premières alternatives aux ressources fossiles pour la production de jet fuel devraient permettre de sécuriser l'approvisionnement, de stabiliser les prix et de diminuer l'empreinte environnementale. Cependant, un avion ayant une durée de vie d'environ 30 ans, le jet fuel produit doit répondre aux spécifications techniques de la flotte actuelle. L'Union Européenne reconnaît la nécessité de promouvoir les énergies renouvelables avec l'objectif complémentaire de développer une nouvelle filière économique compétitive qui sécurise l'approvisionnement tout en favorisant un développement rural de par l'exploitation de résidus agricoles comme matières premières [2 ; 4]. Ainsi, la «European Union Renewable Energy Directive» fixe à 10%

la part minimale d'énergie renouvelable devant être présente dans le secteur des transports en 2020 [2]. L'industrie aéronautique, qui ne fait pas partie de la directive, s'est alignée, en accord avec les acteurs majeurs, sur cette valeur cible. Elle a étendu ses objectifs environnementaux aux contraintes suivantes : accroissement de l'efficacité énergétique de 1.5% d'ici 2020, croissance neutre en carbone à partir de 2020 et réduction de 50% des émissions nettes d'ici 2050 par rapport à 2005. La part occupée par les biocarburants pour atteindre ces objectifs est importante et se situe dans l'ordre de grandeur des bénéfices représentés par une amélioration des procédures de vol plus « intelligentes » (Figure 2).

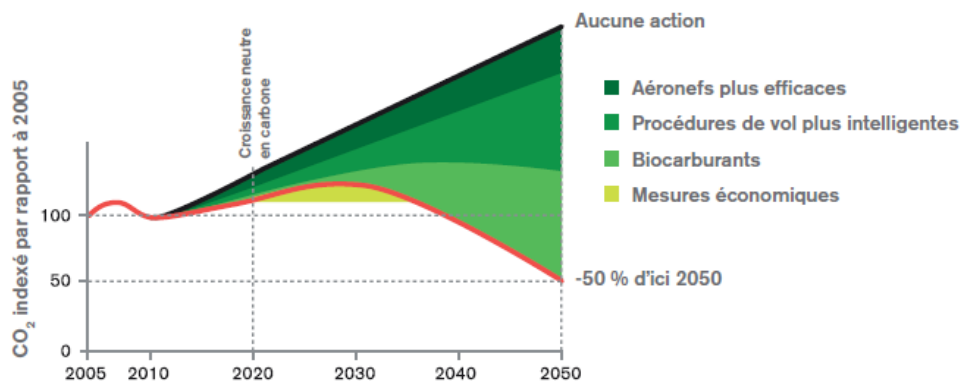


Figure 2: Feuille de route pour la réduction des émissions [4].

3. Les efforts de l'industrie aéronautique

Depuis le premier vol test au biojetfuel en 2008, l'industrie aéronautique, dont Airbus et EADS, a promu et initié des programmes de développement de solutions alternatives au kérosène. A ce jour, 1500 vols commerciaux contenant du biokérosène ont été réalisés par 19 compagnies aériennes [2].

Une initiative marquante est « l'European Advanced Biofuels Flight Path » : en 2011, les services de la Commission européenne, en collaboration étroite avec Airbus, les principales compagnies aériennes européennes (Lufthansa, Air France/KLM et British Airways) et d'importants producteurs de biocarburants européens (Choren Industries, Neste Oil, Biomass Technology Group et UOP), ont lancé une nouvelle initiative industrielle dans le but d'accélérer la commercialisation des biocarburants pour l'aviation en Europe. Il s'agit d'une feuille de route à échéances précises permettant d'atteindre une production annuelle durable de deux millions de tonnes de biocarburants pour l'aviation à l'horizon 2020 [7].

4. Les contraintes des carburants des transports aériens

Afin de garantir la sécurité des vols aériens, le jet fuel d'origine fossile, appelé Jet A ou Jet A1, répond à des spécifications très strictes qui certifient la stabilité du carburant quelles que soient les conditions extrêmes (pression, température) dans lesquelles l'avion évolue (Tableau 1).

Tableau 1: Principales spécifications du jet fuel

Point d'éclair	38°C minimum (Coupe fermée) Pensky-Martens.
Couleur	Incolore / Jaune.
État physique	Liquide.
Odeur	Hydrocarbure.
Point d'ébullition	156 à 258 °C.
Densité	Entre 775 et 840 kg.m⁻³ à 15°C.
Solubilité	insoluble(s) dans l'eau.
Densité énergétique	Minimum 42,8 MJ.Kg⁻¹.
Viscosité	Cinématique: 8 mm².s⁻¹ Maximum à -20°C.

Ainsi, le développement d'un carburant issu de ressources alternatives au pétrole conventionnellement utilisé doit intégrer l'ensemble de ces spécifications. Son utilisation doit être compatible avec les moteurs actuels sans nécessiter un renouvellement de la flotte ni aucune modification des systèmes: c'est le principe du «drop-in fuel» [3]. Dans le cas d'une utilisation d'un nouveau carburant en mélange avec le Jet A1 ou le Jet A, c'est le mélange qui doit remplir les spécifications.

L'IATA insiste cependant sur le fait que le principal obstacle aux biocarburants pour l'aéronautique n'est pas technique mais économique et politique. Il est important de préciser qu'aucun biocarburant n'est actuellement commercialement viable. Pour être rentable, il est essentiel que le biocarburant soit produit et distribué en quantités suffisantes. Augmenter le volume et la disponibilité ferait diminuer les coûts. Une législation et une fiscalisation favorables encourageraient donc le développement de biojetfuels [2].

5. Les solutions alternatives aux carburants fossiles

Les «drop-in fuels» issus de ressources alternatives sont multiples [3]. Ils sont récapitulés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Les alternatives au kérosène fossile issu du pétrole Jet A/Jet A1

Carburant	Description
Anything to Liquid (XtL), Gas to Liquid (GtL), Coal to Liquid (CtL), Biomass to Liquid (BtL),	Carburants obtenus selon le procédé Fischer-Tropsch (FT) : production d'hydrocarbures par réaction entre le monoxyde de carbone et l'hydrogène, certifiés ASTM International (American Society for Testing and Materials) en mélange au Jet A1 dans un ratio de 50%.
HEFA (Hydroprocessed Esters and Fatty Acids)	Huiles hydrotraitées : certification ASTM (American Society for Testing and Materials) en mélange au Jet A1 dans un ratio de 50% en 2010.
DSHC (Direct Sugar to HydroCarbons) Alcanes ou hydrocarbures	Alcanes ou en autres hydrocarbures (terpènes) obtenus par fermentation ou par procédé thermochimique, au stade de recherche.
Composés naphthéniques	Composés naphthéniques obtenus par liquéfaction directe, sous haute pression et haute température et en présence d'un catalyseur à base d'alumine et d'un solvant donneur d'hydrogène ; la matière première pulvérisée (charbon ou bois) est soumise à une hydroconversion et un hydrotraitement. Rendement supérieur au procédé FT et coût inférieur. associé aux produits issus du procédé FT ou aux huiles hydrogénées, pourrait constituer un carburant entièrement alternatif pour l'industrie des transports aériens.
Alcools	Alcools linéaires plus lourds que l'éthanol (trop faible densité) : hexanol, octanol et dodécanol pourraient trouver une application biokérosène.
Dérivés de furane	Obtenus par catalyse métallique à partir de fructose, propriétés intéressantes.
Dérivés d'acide succinique	dérivés d'acide succinique produits par réaction entre l'éthanol et l'acide succinique ; exemple : le diéthyl-succinate (point d'ébullition et un point d'explosion similaires à ceux du kérosène).
Carburants cryogéniques	obtenus à partir de gaz naturel liquéfié et d'hydrogène liquide.

Les carburants issus du procédé Fisher-Tropsch et les huiles hydrotraitées permettent la production d'une coupe paraffine, laquelle ne contient pas les aromatiques, naphthènes et autres constituants essentiels du kérosène. C'est pourquoi, leur utilisation pure n'est pas envisageable, mais toutefois ils sont tous les deux certifiés pour une utilisation dans un mélange à 50% avec le kérosène actuel (Jet A1).

La voie conventionnelle de production d'huile, matière première pour la synthèse d'HEFA, est celle des végétaux oléagineux. Une alternative intéressante peut être l'utilisation d'huiles synthétisées et accumulées par des micro-organismes oléagineux : il s'agit de lipides dits microbiens.

6. L'enjeu des lipides microbiens

La voie de production de lipides microbiens pour des usages biokérosène constitue une alternative prometteuse à la voie végétale conventionnelle avec de remarquables avantages. Si l'on envisage la synthèse de lipides par voie microbiologique (levures, bactéries ou micro-algues), l'éventail des sources de carbones utilisables comme matières premières est élargi à tout substrat organique provenant de la fixation du carbone renouvelable (la biomasse) et tout substrat carboné minéral (CO₂, méthane) issu de différentes filières industrielles chimiques ou biotechnologiques. Ainsi, la filière microbienne permet la valorisation de ressources agricoles renouvelables ou d'effluents et coproduits industriels. En particulier, les effluents carbonés agroindustriels (amidonneries, sucreries), les ressources ligno-cellulosiques, issues des résidus industriels, agricoles et forestiers, et le glycérol industriel, sous-produit majoritaire du biodiesel, paraissent être des substrats renouvelables d'intérêt.

D'autre part, l'utilisation de microbes oléagineux pour la production d'huiles par fermentation permet d'envisager le développement de procédés de production robustes, aux performances reproductibles, indépendantes des contraintes climatiques, géographiques et géopolitiques. La grande diversité de micro-organismes et les spécificités de chacun offrent l'opportunité de production d'une gamme de profils lipidiques ajustables en fonction des contraintes d'usage.

Conclusion

Ainsi, le développement de molécules produites à partir de matières premières durables et alternatives aux ressources fossiles à usages carburants fait partie des moyens à mettre en œuvre pour que l'industrie du transport aérien atteigne ses objectifs environnementaux ambitieux tout en garantissant le développement du secteur, à savoir :

- l'alignement de l'industrie aéronautique avec la «European Union Renewable Energy Directive» qui prévoit l'incorporation de 10% d'énergie renouvelable en 2020 dans le secteur des transports.
- l'accroissement de l'efficacité énergétique de 1.5% d'ici 2020,
- la croissance neutre en carbone à partir de 2020,
- la réduction de 50% des émissions nettes de CO₂ d'ici 2050 par rapport à 2005.

Parmi les différentes solutions envisageables, les huiles hydrotraitées, aujourd'hui certifiées par l'ASTM comme pouvant être utilisées à 50% en mélange avec le kérosène, se présentent comme une perspective intéressante. Alors que la technologie de l'hydrotreatment est connue et maîtrisée, le verrou concerne la production d'huiles en quantités suffisante pour alimenter la filière. L'utilisation de micro-organismes oléagineux, c'est-à-dire la production d'huiles microbiennes par fermentation permettrait de s'affranchir des contraintes climatiques, de garantir une production stable et durable, sans entrer en compétition avec les usages alimentaires. Alors qu'il existe des bactéries, champignons ou micro-algues lipogènes, la mise en place de cultures de levures, extensivement utilisées dans l'industrie, pourrait permettre le développement d'une technologie à court ou moyen terme.

Dans ce contexte, ces travaux de recherche s'inscrivent dans une collaboration initiée en 2005 entre Airbus et l'Equipe de Fermentation Avancée et Génie Microbien (ex Equipe de Génie Microbiologique: Analyse Systémique et Innovation de Procédés) du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Microbiens et Procédés visant à étudier les possibilités de production de lipides à partir de levures oléagineuses pour une application biokérosène. Depuis 1992, au sein de ce laboratoire, il a été notamment mis en évidence les fortes potentialités d'accumulation de lipides de la souche *Rhodotorula glutinis* (Granger, 1992 ; Cescut, 2009). Les travaux présentés dans ce document ont pour objectifs l'étude de l'impact de la diversification des substrats carbonés (xylose et glycérol en simples ou co-substrats avec le glucose) sur le comportement métabolique et dynamique de la souche d'intérêt *Rhodotorula glutinis* (*Rhodospiridium toruloides*), en condition de croissance et d'accumulation lipidique.

Ce document est organisé selon les principales parties suivantes : l'analyse des connaissances et travaux antérieurs sur le métabolisme et la culture de la souche oléagineuse *Rhodotorula glutinis*, qui situe ce travail dans son contexte scientifique et permet de dégager les verrous scientifiques ; les matériels et méthodes qui décrivent l'ensemble des techniques et protocoles expérimentaux utilisés pour réaliser cette étude ; les résultats, qui sont structurés en deux chapitres: le premier chapitre concerne les capacités d'assimilation des substrats et la répartition du carbone en conditions de croissance et le second se focalise sur le devenir du carbone en conditions de limitation nutritionnelle par l'azote à partir des substrats d'intérêt. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit comprend la conclusion générale et des propositions de perspectives.

Etat de l'art.

Partie 2 : Etat de l'art

Le bilan et l'analyse des travaux antérieurs présentés dans ce chapitre sont organisés en cinq sous-parties. La première sous-partie porte sur les micro-organismes oléagineux et plus particulièrement sur les caractéristiques de la levure lipogène *Rhodotorula glutinis*. Dans un second temps, on dresse l'état de l'art actuel quant au métabolisme d'accumulation de substances de réserves de la souche étudiée. Ensuite, le catabolisme de la souche sur les substrats glucose, xylose et glycérol est traité ; avant d'aborder les aspects anaboliques dans le sous-chapitre suivant. Dans une dernière sous-partie, les performances de croissance et d'accumulation lipidiques de *R. glutinis* sont décrites à partir des substrats carbonés glucose, xylose et glycérol.

1. Les micro-organismes oléagineux.

1.1. Définition et caractéristiques.

Alors que le métabolisme de la synthèse lipidique existe chez tous les microbes, certains micro-organismes ont la capacité de synthétiser des lipides de réserve et de les accumuler de manière intracellulaire dans des vacuoles appelées corps lipidiques. Lorsque la teneur en lipides accumulés atteint un minimum de 20 % de la masse sèche des cellules, le micro-organisme est dit oléagineux ou lipogène. (Ratray *et al.*, 1975, Botham *et al.*, 1979).

1.2. Principaux micro-organismes oléagineux.

Les micro-organismes oléagineux peuvent être des bactéries, des champignons, des levures ou des micro-algues (Tableau 3).

Ainsi, même si les profils accumulés sont espèce-dépendantes, il est toutefois possible de souligner des similitudes au sein d'un même règne. Moins connu et caractérisé que celui des autres genres, le potentiel bactérien d'accumulation de triacylglycérols (TAG) est aujourd'hui en cours d'exploration. L'accumulation de TAG se retrouve cependant principalement chez les bactéries appartenant au groupe des actinomycètes telles que les espèces *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* et *Nocardia*.

La recherche concernant les micro-algues oléagineuses a débuté dans les années soixante-dix et s'est intensifiée au cours des dernières années. Alors que le caractère autotrophe des algues permettant l'utilisation de dioxyde de carbone comme substrat est un point fort dans

leur utilisation industrielle, leur cinétique de croissance demeure lente comparativement aux autres micro-organismes allant de 0.2 j^{-1} pour *Botryococcus braunii* à 2.63 j^{-1} pour *Thalassiosira pseudomona*. Avec un taux d'accumulation très intéressant pouvant excéder 70% (*Schizochytrium limacinum*, *Botryococcus braunii*, *Dunaliella tertiolecta*), il reste de nombreux verrous scientifiques et technologiques sur lesquels des équipes de recherche et des industriels se mobilisent afin de faire émerger la filière.

Les champignons filamenteux oléagineux peuvent également accumuler des taux non négligeables de TAG, pouvant par exemple aller jusqu'à 60% de leur masse sèche pour *Cunninghamella japonica*. Soixante-quatre espèces lipogènes ont été recensées (Ratledge *et al.*, 1994). D'une manière générale, la filamentation des champignons complexifie les transferts de masse et de chaleur au sein des réacteurs ce qui joue en défaveur de leur utilisation industrielle en particulier pour la production de molécules à faible valeur ajoutée.

Enfin, les levures oléagineuses ont fait l'objet de nombreuses études qui ont mené à l'établissement de modèles concernant les mécanismes de synthèse et d'accumulation lipidique. Parmi ces espèces, *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toruloides*) se situe parmi celles qui peuvent accumuler les plus importantes teneurs en réserves lipidiques, jusqu'à 72% de leur masse sèche (Tableau 1). En outre, d'un point de vue plus général, la technologie de fermentation des levures est connue, maîtrisée et utilisée dans l'industrie depuis des décennies, ce qui joue en faveur d'un développement à court-moyen terme d'une production basée sur l'utilisation de ce type de micro-organisme. Pour ces raisons, le micro-organisme choisi pour cette étude est la levure lipogène *Rhodotorula glutinis*.

Tableau 3: Teneur lipidique maximale des principaux micro-organismes oléagineux.

Micro-organisme	Pourcentage d'accumulation lipidique (%lipides/gbiomasse)	Références
Micro-algues		
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	Sheehan et al., 1998 d'après Cadoret et al., 2008 ; Chisti 2007
<i>Chlorella protothecoides</i>	55	Xu et al., 2006 d'après Cadoret et al., 2008
<i>Chlorella vulgaris</i>	20-23	Pruvost et al., 2011
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	40	Ratlidge et al., 2002
<i>Cyclotella DI-35</i>	42	Sheehan et al., 1998 d'après Cadoret et al., 2008
<i>Cylindrotheca closterium</i>	17-20	Pruvost et al., 2011
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	71.4	Takagi et al., 2006
<i>Hantzchia DI-160</i>	66	Sheehan et al., 1998 d'après Cadoret et al., 2008
<i>Nannochloris oculata</i>	19.3-59.3	Van Vooren et al., 2012
<i>Nannochloropsis sp.</i>	68	Sheehan et al., 1998 d'après Cadoret et al., 2008
<i>Neochloris oleoabundans</i>	25-37	Pruvost et al., 2009
<i>Nitzschia sp.</i>	50	Sheehan et al., 1998 d'après Cadoret et al., 2008
<i>Schizochytrium limacinum</i>	50-77	Yokochi et al., 1998 d'après Ratlidge et al., 2002 ; Chisti 2007
<i>Thalassiosira pseudomona.</i>	21-31	Brown et al., 1996 d'après Cadoret et al., 2008
Bactéries		
<i>Acinetobacter sp.211</i>	25	Alvarez et al., 1997
<i>Arthrobacter AK19</i>	78	Wayman et al., 1984 d'après Boulton et Ratlidge, 1984
<i>Nocardia corralina</i>	23.9	Alvarez et al., 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa 44T1</i>	38	Alvarez et al., 2002
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	21	Alvarez et al., 2002
<i>Rhodococcus opacus</i>	87	Alvarez et al., 2002
<i>Rhodococcus ruber</i>	26	Alvarez et al., 2002
Champignons filamenteux		
<i>Cunninghamella japonica</i>	60	Ratlidge et al., 2002
<i>Entomophthora coronata</i>	43	Ratlidge et al., 2002
<i>Mortierella alpina</i>	50	Ratlidge et al., 2002
<i>Mucor circinelloides</i>	25	Ratlidge et al., 2002
<i>Pythium ultimum</i>	48	Ratlidge et al., 2002
Levures		
<i>Cyptococcus curvatus</i>	46	Hassan et al., 1996
<i>Candida 107</i>	40	Hall et al., 1977
<i>Candida albidus</i>	44	Hansson et al., 1986
<i>Lipomyces lipofer</i>	36	Boulton et Ratlidge, 1981
<i>Lipomyces starkei</i>	68	Angerbauer et al., 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i> (<i>Rhodospiridium toruloides</i>)	72	Granger, 1992 ; Cescut, 2009
<i>Rhodotorula graminis</i>	36	Ratlidge et al., 2002
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	Ratlidge et al., 2002

1.3. *Rhodotorula glutinis*, une levure oléagineuse d'intérêt.

1.3.1. Classification.

Le genre *Rhodotorulae* appartient à la famille des levures imparfaites *Cryptoccaceae*, sous-famille *Rhodotorulodeae* (Larpen *et al.*, 1991). Il existe 38 espèces de *Rhodotorula* (Shinde *et al.* 2008). *R. glutinis* est communément classifiée comme la phase haploïde de la forme parfaite du basidiomycète *Rhodosporidium toruloïdes* (Mares *et al.*, 1982; Schröter and Kopperschläger, 1996). Cette classification incombe principalement à l'aspect morphologique et à la composition chimique de la paroi, ainsi qu'au mécanisme de formation des bourgeonnements (Mares *et al.*, 1982). Le séquençage récent de *Rhodosporidium toruloïdes* a révélé un génome de 20.2 Mb (Zhu *et al.*, 2012).

1.3.2. Morphologie.

R. glutinis est une levure saprophyte, de forme ovoïde à allongée, pouvant avoir un pseudo ou un vrai mycélium et dont la taille moyenne est de 4 à 10 µm sur 2 à 5µm (Shinde *et al.*, 2008). C'est une espèce hétérothallique, aérobic stricte, qui se reproduit par bourgeonnement multilatéral (Höfer *et al.*, 1969; Mares *et al.*, 1982; Schröter and Kopperschläger, 1996) et dont les cultures ont un couleur rose caractéristique due au potentiel de la souche à synthétiser des β-caroténoïdes (Larpen *et al.*,1991).

Au cours d'une culture en condition d'accumulation lipidique, les cellules de la souche *R. glutinis* s'arrondissent et leur cytoplasme laisse apparaître de nombreux corps lipidiques. Ce changement morphologique n'a cependant rien de comparable avec celui observé chez une autre levure oléagineuse, *Y. lipolytica*, chez qui un dimorphisme a été mis en évidence (Fillaudeau *et al.*, 2009).

1.3.3. Diversité du potentiel de la souche et utilisation industrielle.

La souche d'intérêt est par ailleurs étudiée pour d'autres utilisations que la production de lipides telles que la production de pigments (Gabier *et al.*, 2005), la production de protéines insecticides (Oloke *et al.*, 2006), la production d'α-L-arabinofuranosidase (Martínez *et al.*, 2006) et de phénylalanine ammonia lyase (D'Cunha *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1981).

R. glutinis est un micro-organisme Generally Regarded as Safe (GRAS) et donc de choix pour une utilisation industrielle. Plusieurs brevets visent à explorer le métabolisme oléagineux de la souche *R. glutinis* pour des applications essentiellement biocarburants (Tableau 4). Ainsi, des brevets envisagent l'utilisation de la souche pour la production de protéases, d'alkyl esters d'aspartylphenylalanine et de gamma et delta lactones (Tableau 4).

Tableau 4 : Principaux brevets mettant en œuvre la souche oléagineuse *Rhodotorula glutinis*.

Titre du brevet	Abstract	N° de publication	Date de publication	Déposant
Brevets exploitant les propriétés oléagineuses de la souche :				
Method for producing cacao butter substitute	A method for producing a cacao butter substitute which comprises cultivating a microorganism capable of producing fats and oils rich in 1,3-disaturated-2-unsaturated-triglycerides belonging to the genus <i>Endomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Lipomyces</i> or <i>Rhodospiridium</i> , such as <i>Endomyces vernalis</i> , <i>Rhodotorula gracilis</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula graminis</i> , <i>Rhodospiridium toruloïdes</i> , <i>Lipomyces starkeyi</i> and <i>Lipomyces lipofer</i> , under an aerobic condition, collecting the cells, isolating fats and oils rich in 1,3-disaturated-2-unsaturated-triglycerides from the cells, and optionally subjecting the fats and oils to fractionation.	US 05/677,844	28 juin 1977	Fuji Oil Company, Ltd.
Process for preparation of aspartylphenylalanine alkyl esters	alpha -L-aspartylphenylalanine lower alkyl esters are prepared by a process wherein fumaric acid, ammonia and a lower alkyl ester of L-phenylalanine are contacted with a culture or treated culture of a microorganism belonging to the genus <i>Pseudomonas</i> , and being capable of producing a alpha -L-aspartyl-L-phenylalanine lower alkyl ester from fumaric acid, ammonia and a lower alkyl ester of L-phenylalanine.	EP0074095 B1	30 avr. 1986	Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.
Process for the production of bio-oil from biomass	Process for the production of bio-oil from biomass comprising: - subjecting said biomass to acid hydrolysis in the presence of an aqueous solution of at least one organic acid selected from alkyl- or aryl-sulfonic acids having from C7 to C20 carbon atoms,	WO 2010069516 A2	24 juin 2010	Eni S.P.A.

	or from halogenated carboxylic acids, at a temperature ranging from 80 °C to 160 °C, obtaining a first mixture comprising a first solid phase and a first aqueous phase; - subjecting said first mixture to enzymatic hydrolysis, obtaining a second mixture comprising a second solid phase and a second aqueous phase; - subjecting said second aqueous phase to fermentation in the presence of at least one oleaginous yeast, obtaining an aqueous suspension comprising cells of said oleaginous yeast; - subjecting said aqueous suspension to thermal treatment obtaining an oily phase comprising bio-oil and a third aqueous phase. The bio-oil thus obtained can be advantageously used in the production of biofuels.			
Biofuels from lignocellulosic resources	A method comprising separating a lignocellulosic resource into a substantially cellulosic portion and a substantially non-cellulosic portion; and fermenting the substantially cellulosic portion to produce microbial oil, pyrolyzing the substantially non-cellulosic portions to produce bio-oil or fermenting the substantially cellulosic portion to produce microbial oil and pyrolyzing the substantially non-cellulosic portion to produce bio-oil.	EP2513261 A2	24 oct. 2012	Honeywell International Inc
<i>Rhodotorula glutinis</i> oil genetic engineering strain and construction method and application thereof	The invention relates to a <i>Rhodotorula glutinis</i> oil genetic engineering strain, a construction method and an application thereof. The construction method of the genetic engineering strain is mainly as follows: utilizing rDNA (recombinant deoxyribonucleic acid) of <i>Rhodotorula glutinis</i> as a target sequence for homologous integration, using strong promoter genes PGK1 of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and malate dehydrogenase genes ME of <i>Chaetomium cochloides</i> to construct an expression	CN102796675 A	28 nov. 2012	南阳奇伟微生态基因科技开发有限公司 Nanyang Kiwi Microecological Gene Technology Development Co., Ltd

	vector to be introduced into <i>Rhodotorula glutinis</i> , and enabling ME genes to obtain high-efficient expression in a <i>Rhodotorula glutinis</i> body, wherein the content of lipid in a transformant is improved by 2.5 times in comparison with a wild strain. According to the construction method disclosed by the invention, key enzyme genes and a strong promoter for anabolism of the lipid are introduced on the basis that the anabolism of microbial oil is known, so that the lipid metabolism is regulated and controlled, and the yield of oil is improved. The genetic engineering strain can be applied to production of the microbial oil and development of functional oil related products, such as medicaments, health care products.			
Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi	The present invention provides systems for producing engineered oleaginous yeast or fungi that express carotenoids	US 20130045504 A1	21 févr. 2013	Dsm Ip Assets B.V.
Methods and compositions for producing squalene using yeast	Provided herein compositions and methods for producing isoprenoids, including squalene. In certain aspects and embodiments provided are genetically converted yeast and uses therefore. In some aspects and embodiments, the genetically converted yeast produce isoprenoids, preferably squalene. Also are provided methods of producing squalene using a genetically converted yeast or a non-genetically converted yeast. The invention also provides squalene produced by genetically converted yeast or non-genetically converted yeast.	US8470568 B2	25 juin 2013	Nucelis Inc.

Pyrolysis oil and other combustible compositions from microbial biomass	Oleaginous microbial biomass is subjected to pyrolysis to make microbial pyrolysis oil for use as a fuel or is otherwise formed into combustible products for the generation of heat and/or light.	EP2686404 A2	22 janv. 2014	Solazyme, Inc.
Process for the production of bio-oil from solid urban waste	A process for the production of bio-oil from solid urban waste, comprising the following steps: a) subjecting said solid urban waste to liquefaction, obtaining a mixture including an oily phase consisting of bio-oil, a solid phase and an aqueous phase; b) subjecting the aqueous phase obtained in the liquefaction step a) to fermentation, obtaining a fermented biomass; c) feeding the fermented biomass obtained in the fermentation step b) to the liquefaction step a). The bio-oil (or bio-crude) thus obtained can be advantageously used in the production of biofuels which can be used as such or mixed with other motor vehicle fuels. Alternatively, this bio-oil (or bio-crude) can be used as such (biocombustible) or mixed with fossil combustibles (combustible oil, coal, etc.) for the generation of electric energy or heat.	EP2475744 B1	30 avr. 2014	ENI S.p.A.
Brevets exploitant les propriétés autres que les propriétés oléagineuses de la souche :				
Acid protease and method of preparing the same	An acide prttease which is not inactivated by sodium lauryl sulfate and is stable at 50°C, at pH 1.5 to 6.0 for two hours can be recovered from media on which certain yeasts of the genus Rhodotorula were cultured. It is useful in the hydrolysis of soyeane protein and of other proteins.	US3677898 A	18 juil. 1972	Ajinomoto Kk
Process for the microbiological production of gamma and delta lactones	Process for the production of gamma- or delta-lactones according to the general formula: (I) in which R is a saturated, mono-, di- or triunsaturated linear alkyl chain comprising from 2 to 10 carbon	EP19900402217	22 nov. 1995	Pernod-Ricard

	atoms and in which R1 is alkylene comprising 2 or 3 carbon atoms, entailing the operation which consists in culturing, in a substrate comprising a hydroxide or hydroperoxide of linoleic acid or of linolenic acid, of their esters or of their glycerides, or of an oleic acid derivative obtained by the photooxygenation of oleic acid or autoxidation of fats which contain it, a microorganism capable of performing beta-oxidations of said substrate.			
Culturing <i>Rhodotorula</i> using extract of soybeans or germs of soybeans as nutrient and substrate.	The present invention relates to a process for preparing isoflavone aglucone using <i>Rhodotorula glutinis</i> , more specifically, to a novel <i>Rhodotorula glutinis</i> strain (KCCM-10172) which can be isolated from fermented soybeans and has a good ability to convert into isoflavone aglucone, and a process for preparing isoflavone aglucone using the said strain which comprises culture for 30-54 hours in a condition of pH 4.0-8.0 and 25-35° C. using an extract from soybeans or germs of soybeans as a medium and control of content of dissolved oxygen to produce isoflavone containing aglucone of a purity of 90% or more.	US6245536 B1	12 juin 2001	Shin Dongbang Corporation

1.4. Nature des lipides microbiens accumulés par *Rhodotorula glutinis*.

1.4.1. Les triacylglycérols.

Les lipides microbiens accumulés se trouvent majoritairement sous la forme d'acylglycérols. Ce sont des lipides neutres résultant d'une réaction d'estérification entre des acides gras et une molécule de glycérol (Figure 3). Il existe des mono-, di- et triacylglycérols ou triglycérides (TAG).

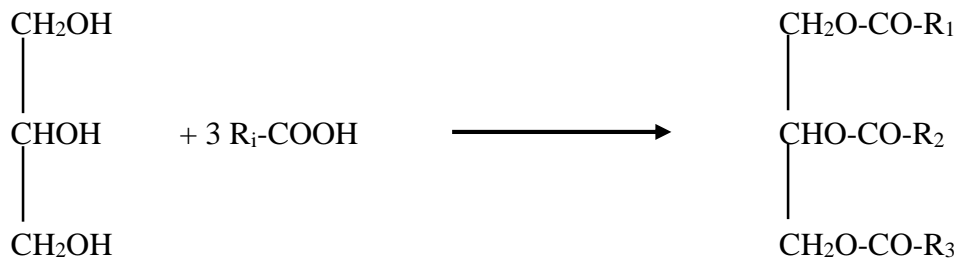


Figure 3 : Réaction de formation d'un triacylglycérol.

R1, R2 et R3 représentent des acides gras de longueur de chaîne carbonée variable avec la fonction alcool d'une molécule de glycérol.

La réaction de formation des TAG permet l'accumulation lipidique de par la détoxification des acides gras libres. Si les trois acides gras sont identiques, le triglycéride est dit homogène ; s'ils sont différents, il est hétérogène. Le rôle principal des triglycérides est le stockage de carbone et donc d'énergie : la densité énergétique spécifique des TAG est en moyenne de 39 MJ.kg⁻¹, ce qui est du même ordre de grandeur que le gasoil (40 MJ.kg⁻¹) ou le kérosène (43.3 MJ.kg⁻¹). De même que chez les végétaux, le profil lipidique est espèce-dépendant, il existe donc une grande diversité et un large panel de TAG microbiens (Tableau 5) :

- Globalement, chez les champignons, les levures et les bactéries, la longueur des chaînes aliphatiques est comprise entre 16 et 18 atomes de carbone, tandis que chez les micro-algues le profil lipidique est différent, de par la présence minoritaire d'acides gras à chaîne plus courte (14 atomes de carbone) et majoritaire plus longue (22 atomes de carbone).

- Les acides gras majoritaires chez les levures et les champignons sont les acides palmitique (n-hexadécanoïque C16:0) et oléique (cis-9-octadécénoïque, C18:1), à l'exception de *Yarrowia lipolytica* qui synthétise principalement l'acide linoléique (cis-9-12-octadecadiénoïque) C18:2.
- L'acide palmitoléique (cis-9-hexadécénoïque, C16:1) est très peu accumulé chez les algues, les levures et les champignons, il est inexistant dans la composition des huiles végétales, alors qu'il est un constituant non négligeable dans les huiles bactériennes.
- Le profil lipidique de *Rhodotorula glutinis* est semblable à l'huile de palme et proche de l'huile d'olive qui est très fortement centré autour du composé majoritaire C18:1.
- Le profil lipidique de *Yarrowia lipolytica* est quant à lui proche de celui de l'huile de soja.

En conclusion, par sa grande capacité d'accumulation (72%) et son profil lipidique centré, *Rhodotorula glutinis* est une levure oléagineuse d'intérêt et un potentiel candidat pour une production à échelle industrielle.

Tableau 5 : Composition en acides gras totaux des lipides accumulés chez les principaux micro-organismes lipogènes (T : traces) comparées aux principales huiles végétales.

Micro-organisme	%C16:0	%C16:1	%C18:0	%C18:1	%C18:2	%C18:3	autres	Références
Micro-algues								
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	16	1	-	21	1		C14:0 : 16% C22 :6 : 40%	Ratledge et <i>al.</i> , 2002
<i>Schizochytrium limacinum</i>	56	-	1	-	-	-	C14 :0 : 4% C22:6 : 30%	Yokochi et <i>al.</i> , 1998, d'après Ratledge et <i>al.</i> , 2002
Bactéries								
<i>Arthrobacter AK19</i>	30	14	6	30	T		T	Wayman et <i>al.</i> , 1984 D'après Boulton et Ratledge, 1985.
Champignons filamenteux								
<i>Cunninghamella japonica</i>	16	-	14	48	14	8		Ratledge et <i>al.</i> , 2002
<i>Mortierella alpina</i>	19	-	8	28	9	8	20:4 : 21%	Ratledge et <i>al.</i> , 2002
Levures								
<i>Lipomyces starkei</i>	34	6	5	51	3	-		Ratledge et <i>al.</i> , 2002
<i>Rhodotorula glutinis</i>	37	1	3	47	8	-		Ratledge et <i>al.</i> , 2002
<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	6	1	28	51	1		Ratledge et <i>al.</i> , 2002
Huiles végétales								
Huile de palme	39,3 -47,5	-	3,5 -6	36 -44	9-12	T		CODEX STAN 210-1999
Huile de colza	1,5 – 6,0	-	0,5 - 3,1	8 - 60	11 - 23	5 - 13		CODEX STAN 210-1999
Huile d'olive	10,5	-	3	70	6,5	0,5		Site de l'ANSES (Ansespro.fr)
Huile de soja	8 - 13,5	-	2 – 5,5	17 -30	48 -59	4,5 -11		CODEX STAN 210-1999

1.4.2. Les caroténoïdes.

Outre l'accumulation de TAG *Rhodotorula glutinis* a pour particularité la synthèse de caroténoïdes, molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Cette famille de pigments naturels de couleur jaune à rouge dérivés de l'isoprène se compose de longues chaînes carbonées de 40 atomes de carbones contenant une à quinze doubles liaisons. Les principaux caroténoïdes sont les carotènes (β -carotène et torulène) et les xanthophylles (astaxanthin and canthaxanthine) (Figure 4).

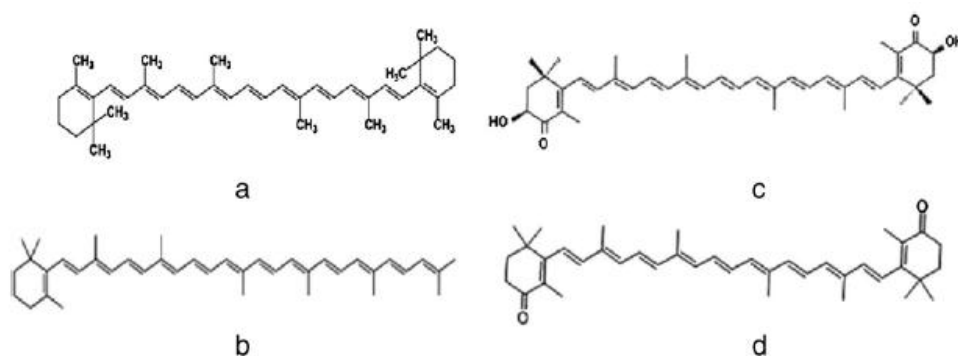


Figure 4 : Molécules de carotènes (a) β -carotène et b) torulène) et de xanthophylles (c) astaxanthin and d) canthaxanthine) (Mata Gomez et *al.*, 2014).

Rhodotorula glutinis synthétise principalement du β -carotène (25-43% des caroténoïdes totaux) et du torulène (28 à 30% des caroténoïdes totaux). Les meilleurs résultats obtenus, à savoir 630mg caroténoïdes totaux.gCDW⁻¹, sont issus d'une culture de 120h en mode batch avec pour seule source carbonée du mout de raisin (Buzzini et Martini, 1999, Buzzini et *al.*, 2001).

2. Métabolisme d'accumulation de substances carbonées de réserves de la levure oléagineuse *Rhodotorula glutinis*.

2.1. L'accumulation de lipides.

2.1.1. Biochimie et stœchiométrie de la synthèse des acides gras et des triglycérides.

La biosynthèse des acides gras chez les levures se fait selon les deux principales étapes suivantes : la génération d'acétyl-CoA, la synthèse de malonyl-CoA puis sa conversion en acide gras.

2.1.1.1. Synthèse d'acétyl Co-A

L'acétyl-CoA provient essentiellement du citrate. Le citrate, formé dans la mitochondrie, est alors exporté vers le cytosol et transformé en acétyl-CoA et en oxaloacétate grâce à l'ATP Citrate Lyase (ACL), enzyme clé des microorganismes oléagineux. L'oxaloacétate est ensuite décarboxylé en malate par la malate déshydrogénase et retourne ainsi vers la mitochondrie via la citrate/malate translocase.

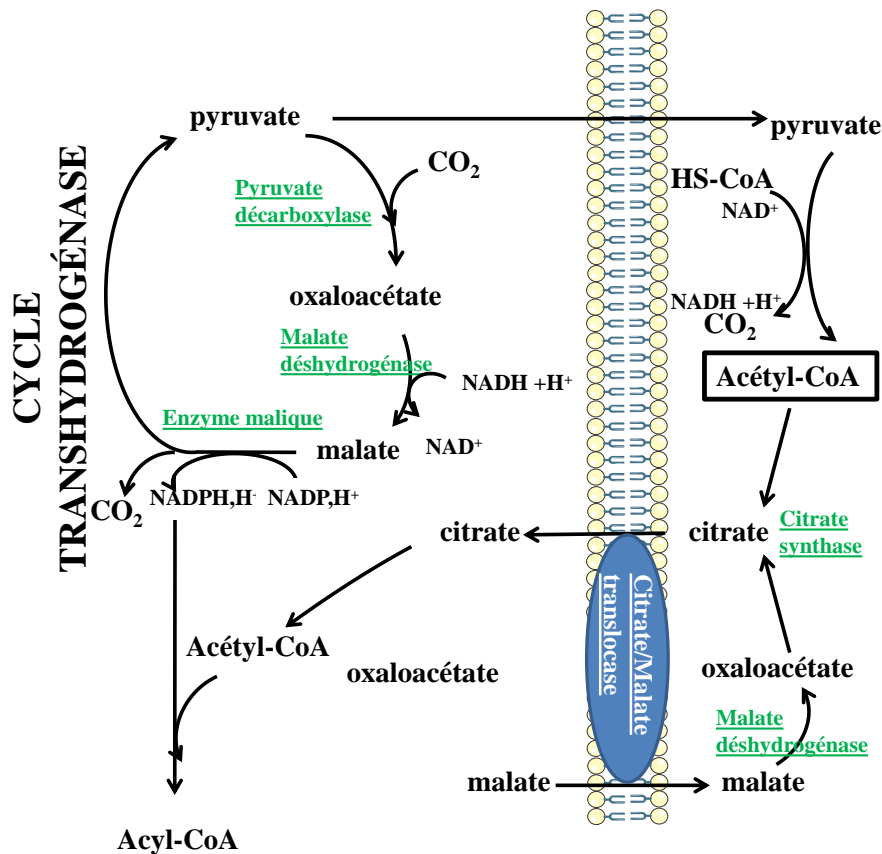


Figure 5 : Synthèse de l'acétyl-CoA, production de pouvoir réducteur et cycle citrate/malate (Ratledge, 2002; Wynn et al., 1999)

Une voie alternative de synthèse de l'acétyl-CoA pourrait également provenir de la β -oxydation de par la dégradation d'acides gras et des lipides membranaires dans un processus d'autophagie propre aux organismes oléagineux (Zhu et al., 2012).

2.1.1.2. Synthèse du malonyl-CoA via l'acétyl-CoA carboxylase.

La première étape de la synthèse des acides gras fait intervenir l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui catalyse la synthèse de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA, de carbonate et d'une

molécule d'ATP. Cette enzyme se trouve dans le cytoplasme, les mitochondries et les peroxysomes et est biotine dépendante. Le magnésium est un catalyseur de la réaction. Cette étape est considérée par certains auteurs comme l'étape limitante de la synthèse d'acides gras (Goodridge *et al.*, 1991).

Chez *S. cerevisiae*, l'acétyl-CoA carboxylase est une protéine de 2233 acides aminés d'un poids moléculaire de 250 kDa (Alfeel *et al.* 1993). Chez *Rhodospiridium toruloïdes* elle est codée par le gène ACC1. Chez la souche oléagineuse *Candida 107*, l'enzyme est activée par la présence d'acides tricarboxyliques comme le citrate permettant l'agrégation des monomères en un complexe multifonctionnel de 7 à 10.10⁶ Daltons (Vance and Vance, 1991, Hall *et al.*, 1977). Les dérivés d'acyl-CoA sont des inhibiteurs potentiels. L'enzyme est régulée par phosphorylation. Une protéine kinase A phosphoryle et active une kinase-kinase qui phosphoryle une « AMP-activated kinase » qui elle-même phosphoryle l'ACC (Chirala *et al.* 1992). Plus l'ACC est phosphorylée, plus elle est sensible à l'inhibition induite par les acyl-CoA. Cette enzyme possède deux sites catalytiques distincts : l'activité biotine carboxylase et l'activité carboxyl transférase. Au final, la réaction catalysée peut s'écrire selon l'équation 1.



Le malonyl-CoA ainsi formé va alors entrer dans la chaîne de synthèse des acides gras.

2.1.1.3. Synthèse et élongation des chaînes d'acides gras.

La formation d'une chaîne d'acide gras résulte de la condensation d'un malonyl-CoA sur un résidu acyl préexistant (Figure 6). Cette réaction est catalysée par un complexe multienzymatique, l'acide gras synthétase (ou Fatty acid synthase soit FAS). Il existe deux types d'acide gras synthétase : le complexe multi-enzymatique cytosolique de type I et le système dissocié mitochondrial de type II (Zhu *et al.*, 2012, Tehlivets *et al.*, 2007) .

Chez les champignons, les FAS sont généralement composés de huit domaines distincts et organisés en deux sous-unités ou en un seul polypeptide (Jenni *et al.*, 2007). *R. toruloïdes* possède une FAS particulière comparativement aux autres champignons. Elle est en effet composée de deux sous-unités : la sous-unité β porte les activités acétyl-transférase et énoyl-réductase (contre les fonctions suivantes chez les autres champignons : acyl-carrier-protein, 3-

cétoréductase, 3-cétosynthase et phosphopantéthéine transférase) et la sous-unité α porte l'ensemble des autres activités (Zhu et al., 2012).

La FAS mitochondriale (type II) porte les activités enzymatiques sur des polypeptides distincts. La protéine Acp1 (Acyl-carrier-protein) porte le groupe prosthétique phosphopantéthéine. Chez *R. toruloïdes*, deux séquences identiques entre elles et à celles des autres champignons codants pour des protéines Acp ont été identifiées (Zhu et al 2012). Ainsi, la FAS 2 de *R. toruloïdes* contient deux Acp. Etant donné le rôle-clé des Acp dans le transport des chaînes d'acides gras en cours d'élongation, la présence d'un tandem pourrait augmenter l'efficacité de cette biosynthèse. Par ailleurs, la protéine Cam1 porte l'activité β -céto-ACP-synthase et la protéine Oar1 porte l'activité 3-oxoacyl-ACP-réductase. L'activité 3-hydroxyacyl-thioester-déshydratase est portée par la protéine Htd2 et l'activité énoyl-ACP-réductase par la protéine Etr1. La protéine Ppt2 fonctionne comme une transférase phosphopantéthéine ; elle catalyse l'attachement du groupe prosthétique phosphopantéthéine sur l'Acp (Zhu et al., 2012).

Les expressions des gènes *FAS1*, *FAS2*, et *ACC1* sont régulées de manière coordonnée. L'expression de la *FAS* serait régulée par le même promoteur que celui impliqué dans la synthèse des phospholipides et serait ainsi activée lors d'une limitation cellulaire en inositol et en choline (inositol/choline-response element) (Schüller et al., 1992 ; Chirala et al., 1992).

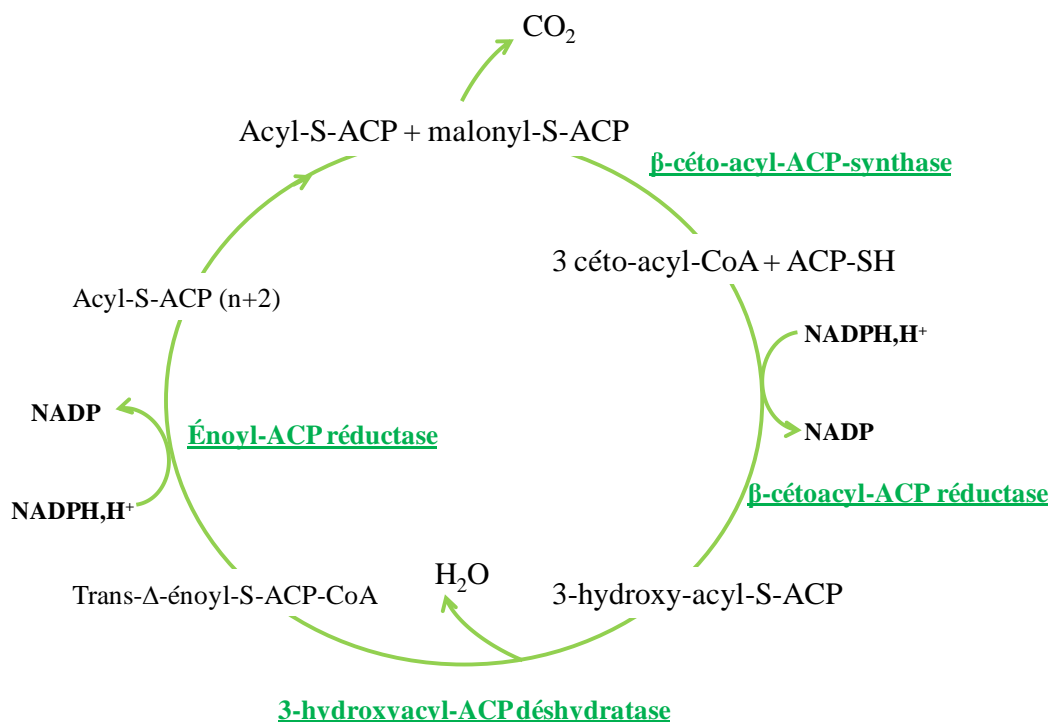


Figure 6 : Cycle d'élongation d'une chaîne d'acide gras.

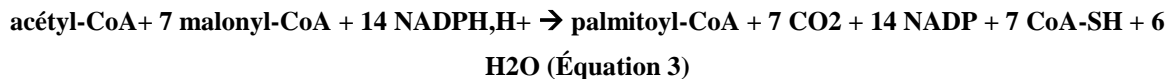
Un acyl-CoA est condensé à un malonyl-CoA pour former un 3-cétoacyl-CoA qui est réduit en 3-hydroxy-acyl-CoA. Ce dernier est déshydraté en trans-Δ²-énoyl-CoA puis réduit en acyl-CoA dont la chaîne comporte deux carbones de plus. A chaque cycle, une molécule de CO₂ et d'H₂O sont produites et deux molécules de NADPH sont oxydées. Le cycle est répété jusqu'à atteindre le nombre final de carbone de l'acide gras synthétisé.

La synthèse des chaînes d'acide gras peut être divisée en 5 étapes distinctes composant un cycle de condensation (Figure 6). L'acétate et le malonate sont transférés du CoA-SH sur la protéine porteuse d'acyle (Acp). La synthase ajoute deux carbones à l'acide gras en produisant une molécule de CO₂ et un acide gras à deux carbones supplémentaires. Le groupe β-cétonique produit par cette condensation est ensuite éliminé par deux réductions et une déshydratation. Chaque cycle ajoute deux carbones à la chaîne aliphatique. L'élongation dépend de la présence de malonyl-CoA, de NADPH et d'acides gras activés à longue ou moyenne chaîne (Dittrich et al., 1998). L'élongation s'arrête en général après 7 ou 8 cycles. Ainsi, la majorité des acides gras synthétisés sont le palmitate (16 atomes de carbone) et le stéarate (18 atomes de carbone). L'acide gras néosynthétisé est libéré du complexe FAS par hydrolyse via l'action d'une thioestérase ou par transfert d'un groupement acyl (Equation2).

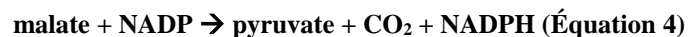


L'élargissement au-delà de 18 carbones se déroule dans le cytosol ou sur les membranes respectives du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie. Dans ce cas, les réactions sont identiques à celles réalisées par l'acide gras synthétase.

L'arrêt de l'élargissement peut dépendre du rapport des concentrations intracellulaires en acétyl-CoA et malonyl-CoA, qui est lui-même fonction des activités acétyl-CoA synthétase et acétyl-CoA carboxylase (Granger, 1992). Si le malonyl-CoA est présent en grande quantité, les chaînes d'acides gras seront plus longues. Au contraire, lorsque le rapport acétyl-CoA/malonyl CoA est supérieur à 0,1 et que l'activité acétyl-CoA transacylase est élevée, la majorité des acides gras synthétisés ont une longueur de chaîne inférieure à 14 carbones. Il est aussi possible que l'arrêt précoce de l'élargissement des chaînes soit dû à l'action d'une seconde thioestérase qui hydrolyse sélectivement les chaînes d'acide gras de longueur moyenne (Wakil et *al.*, 1983). D'autre part, l'acide gras synthétase est inhibée par les acides gras à longue chaîne (Tehlivets et Scheuringer, 2007). L'équation 3 représente le bilan de l'action de la FAS (Davies et Holdsworth, 1990).



Ainsi, le coût en pouvoir réducteur est de deux moles de NADPH à chaque incorporation d'une mole d'acétyl-CoA. La synthèse d'une mole d'acide gras à 18 carbones utilise ainsi 16 moles de NADPH. La réaction majoritaire productrice de NADPH, H⁺ semble être celle catalysée par l'enzyme malique, réaction incorporée dans le cycle de transhydrogénation du NADH (Equation 4).



La provenance du malate cytoplasmique est liée à la glycolyse produisant du pyruvate qui est alors carboxylé en oxaloacétate lui-même transformé en malate, tandis que le malate issu du citrate via le cycle de Krebs est équimolairement utilisé pour la translocation du citrate (Figure 5).

2.1.1.4. La désaturation.

Les acides gras néosynthétisés sont insaturés. Quand elle a lieu, la désaturation se déroule à l'issue de l'étape de synthèse de l'acide gras. Celui-ci est séquentiellement désaturé à partir de la position $\Delta 9$ puis $\Delta 12$ et enfin parfois en position $\Delta 15$ (Moreton *et al.*, 1985). Les levures disposent d'enzymes spécifiques de désaturation permettant la production d'acides gras mono et polyinsaturés. Les désaturases sont des acyl-CoA désaturases, protéines hydrophobes ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique, au niveau des microsomes (Holloway and Katz, 1972). L'acyl-CoA désaturase, via une réaction d'oxydation stéréospécifique, introduit une liaison insaturée à un emplacement précis dans un acide gras qui est lié à un Coenzyme-A. Cette réaction consomme une molécule d'oxygène, deux électrons et des coenzymes réduits (Figure 7). Elles sont codées par les gènes *OLE1* et *OLE2* chez *S. cerevisiae* (Stukey *et al.*, 1989 ; Stukey *et al.*, 1990). La régulation de ces gènes est liée à la présence d'acides gras qui, saturés, ont un effet faiblement activateur et, insaturés, un effet fortement inhibiteur (Mc Donough *et al.*, 1992).

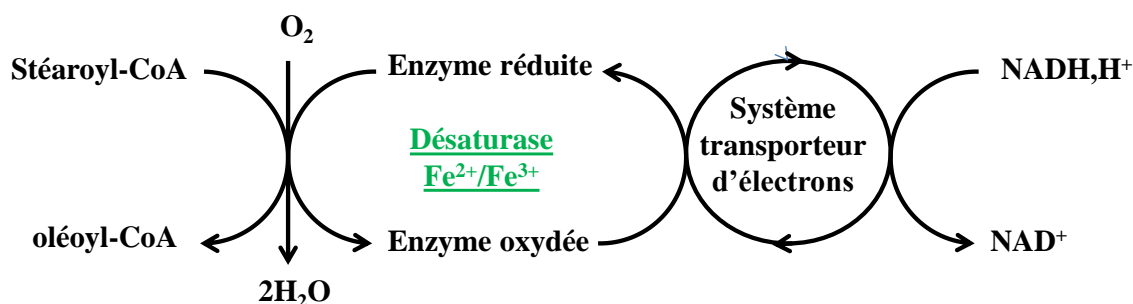


Figure 7: Schéma représentant le système de désaturation aérobie et localisation de la cis-élimination des deux atomes d'hydrogène sur la chaîne d'acide stéarique. (Moreton *et al.*, 1985 ; Holloway and Katz, 1972)

Le cytochrome b5 est le donneur d'électrons. La désaturase accepte les électrons provenant d'un système transporteur d'électrons composé de l'association du cytochrome b5 et de l'enzyme NADH-dépendant cytochrome b5 réductase dont un ion ferrique constitue le centre catalytique (Holloway *et al.*, 1972).

Chez les levures, le résidu oléoyl est tout d'abord transféré de l'ACP ou du coenzyme A sur un phospholipide, généralement la phosphatidylcholine ou dans une moindre mesure la phosphatidyléthanolamine, afin que la désaturation de la chaîne puisse se poursuivre (Ferrante et Kates, 1983, Ratledge, 2004) (Figure 8).

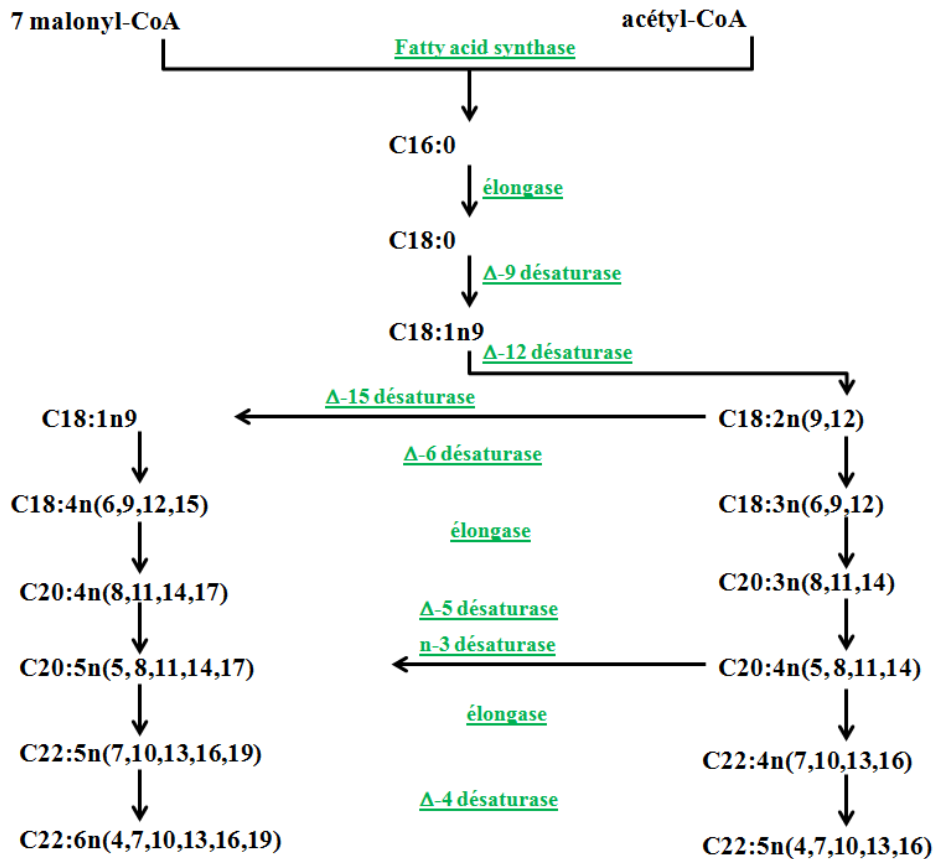


Figure 8: voies de synthèse possibles des acides gras à longue chaîne et polyinsaturés chez la levure (Ferrante et Kates, 1983, Ratledge, 2004).

2.1.1.5. Synthèse des triacylglycérols.

La synthèse de TAG se fait, chez la levure, à partir d'acyl-CoA. Les acyl-CoA peuvent être utilisés dans la voie de synthèse des lipides selon trois voies : celle des esters de stérol, celle des phospholipides qui consistent en une molécule de glycérol estérifiée avec deux acides gras et un phosphate et celle des triglycérides (TAG) qui se composent d'une molécule de glycérol portant sur chacune des trois fonctions hydroxyle un acide gras. La comparaison lipidomique et génomique entre *Y. lipolytica* - levure oléagineuse - et *S. cerevisiae* indique que le métabolisme de l'acétyl-CoA chez les souches oléagineuses est davantage dirigé vers la formation de triglycérides (Beopoulos et al., 2008). Le stockage des acides gras sous forme de triglycérides permet une accumulation importante non toxique pour la cellule. Chez la plupart des micro-organismes, les TAG sont synthétisés par la voie directe du glycérol (Figure 9). Les acyl-CoA produits sont estérifiés avec une molécule de glycérol-3-phosphate en triglycérides grâce à l'action d'acyltransférases spécifiques des positions réactionnelles sur le glycérol (Ratledge et al., 1987).

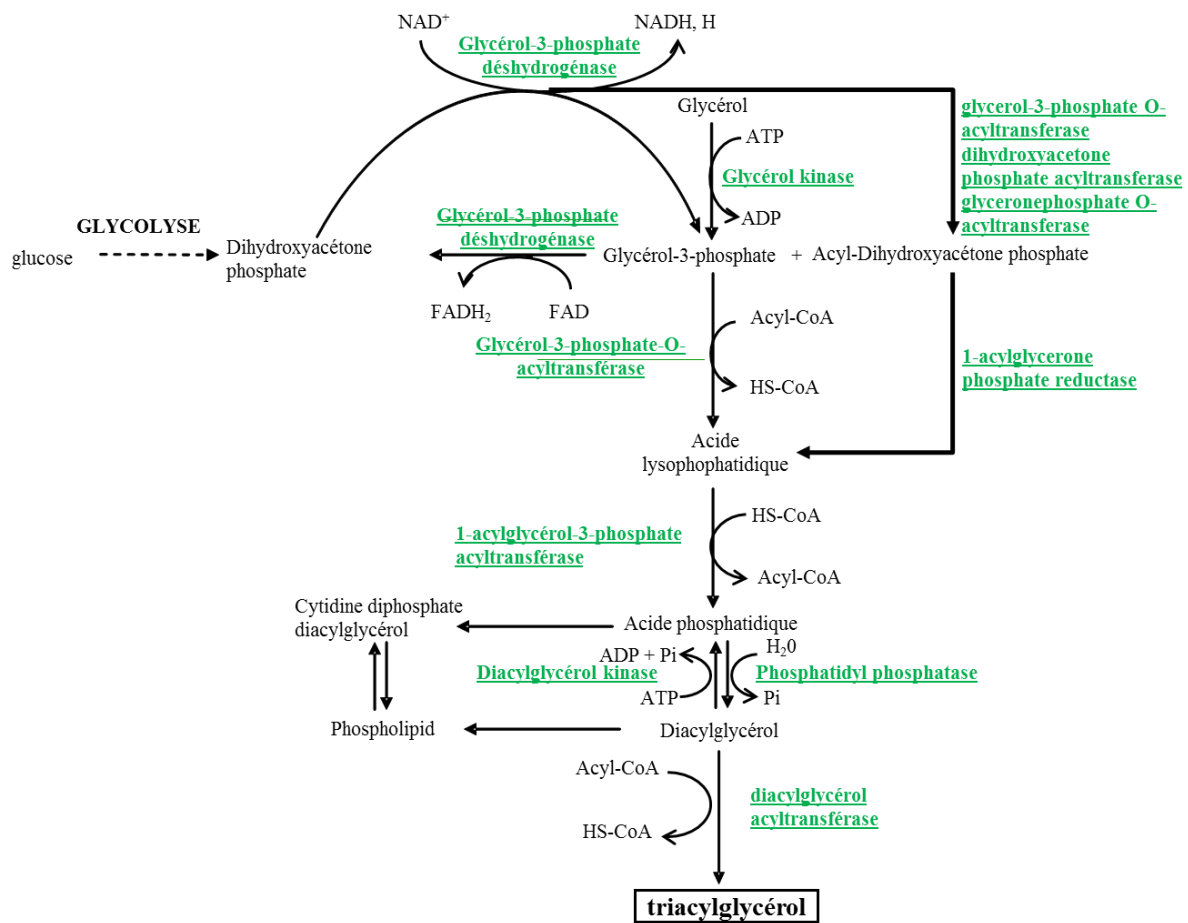


Figure 9 : Voie de synthèse des triacylglycérols, ou voie de Kennedy, chez *Rhodosporidium toruloïdes*.

2.1.2. Le mécanisme de l'accumulation lipidique

2.1.2.1. L'induction du métabolisme d'accumulation

L'accumulation lipidique est déclenchée par un changement du métabolisme du microorganisme, sous l'effet de limitations ou de carences nutritionnelles associées à un apport de carbone suffisant. C'est ainsi qu'une limitation ou une carence en azote du milieu de culture du microorganisme oléagineux induit des réactions aboutissant à la surproduction d'acétyl-CoA (Hall et al., 1977 ; Briffaud et Engasser, 1979 ; Boulton et Ratledge, 1981 ; Davies et Holdsworth, 1990 ; Moresi et al., 1994 ; Anastassiadis et Rehm, 2005) (Figure 10).

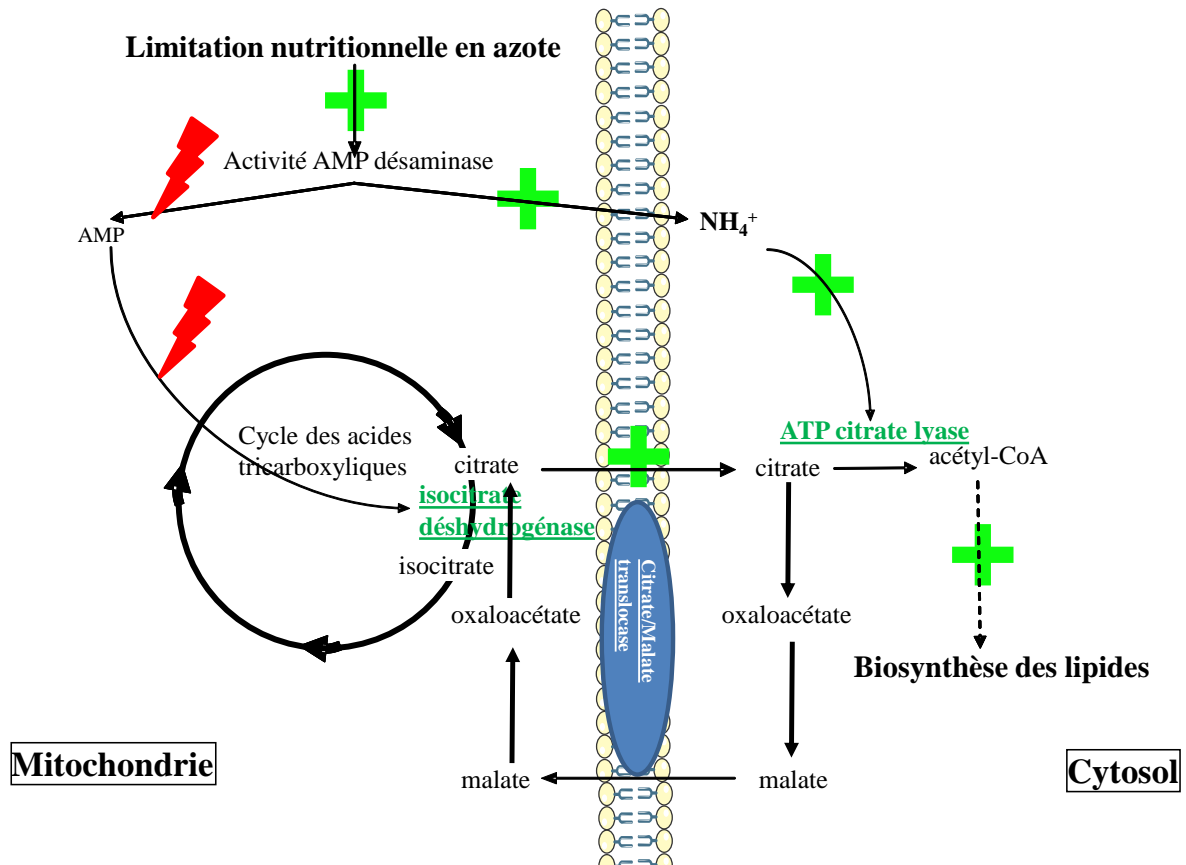


Figure 10 : Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses.

Lors de la limitation en azote, il y a augmentation de l'activité de l'adénosine monophosphate (AMP) désaminase qui catalyse la réaction décrite par l'équation 5.



Ainsi, l'augmentation d'activité de cette enzyme entraîne une baisse de la concentration en AMP dans le cytosol et dans la mitochondrie avec également une augmentation de la concentration en ion ammonium (Boulton et Ratledge 1981). La diminution de la concentration en AMP dans la mitochondrie stoppe l'activité de l'isocitrate déshydrogénase. Ce phénomène s'explique soit par le fait que cette enzyme est strictement dépendante de la présence d'AMP, soit parce que l'accumulation de NH_4^+ diminuerait l'effet de rétro-inhibition du citrate sur la phosphofructokinase autorisant un flux illimité de carbone à travers la glycolyse (Habison et *al.*, 1979 ; Kubicek et Röhr, 1980). De ce fait l'isocitrate ne peut plus être catabolisé ; il s'accumule et s'équilibre avec l'acide citrique (action de l'enzyme aconitase). Le citrate s'accumule alors dans la mitochondrie. Les mitochondries des levures oléagineuses sont reconnues comme possédant une concentration en citrate de trois à quatre fois supérieure par

rapport aux levures non oléagineuses, ce qui permet ensuite la mise en place du métabolisme d'accumulation des lipides selon les étapes décrites ci-dessus (cf. paragraphe 2.1.1.) (Evans et *al.*, 1983).

Outre l'induction de la biosynthèse lipidique, il est important de souligner qu'une limitation ou une carence en azote induit une réponse métabolique plus globale, touchant le métabolisme central. En particulier, on observe l'induction de l'autophagie par l'inactivation du complexe Target Of Rapamycin (TOR), impliqué dans la croissance cellulaire et dans la régulation du métabolisme, la modification des phénomènes de transport, la surexpression des perméases de l'ammonium et des acides aminés, la surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote (en particulier les séquences codant la glutamate déshydrogénase, la glutamine synthase et la glutamate synthase et les séquences des gènes codant pour la dégradation de l'urée et de l'urate) alors que parallèlement la synthèse de macromolécules et le métabolisme cellulaire sont ralentis (Zhu et *al.*, 2012, Wullschleger et *al.*, 2006). L'analyse transcriptomique et protéomique de *R. toruloïdes* a plus spécifiquement révélé la surexpression des gènes codant la protéine Fas et la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des isoprénoïdes, d'où la synthèse accrue de β -caroténoïdes responsable de la couleur rose des cultures. D'une manière plus surprenante, les gènes impliqués dans les voies de dégradation des lipides sont aussi surexprimés (lipolyse, β -oxydation, shunt glyoxylate), peut-être du fait de leur rôle dans le phénomène d'autophagie. Par ailleurs, la synthèse de certaines enzymes impliquées dans la glycolyse est inhibée (Zhu et *al.*, 2012).

2.1.2.2. Facteurs influençant l'accumulation lipidique.

Les limitations nutritionnelles

Bien que la limitation ou la carence en azote soit la plus connue et donc la plus étudiée pour la synthèse lipidique, d'autres éléments peuvent avoir un effet similaire. Ainsi, par exemple, l'effet de la carence en phosphore, zinc ou fer a été testé sur la production de lipides d'une souche de *Rhodotorula glutinis* sur substrat glucose (Granger et *al.*, 1993). Bien que le métabolisme lipidique soit initié lors de l'ensemble des carences testées, il en ressort que les meilleurs rendements apparents de conversion du sucre en lipides sont observés lors d'une limitation en azote (Tableau 6).

Tableau 6: Performance d'accumulation lipidique (teneur en lipides et rendement) suivant différentes limitations nutritionnelles chez *R. glutinis* (Granger, 1992).

Limitation	% lipide [$\text{g}_{\text{lip}}.\text{g}_X^{-1}$]	Rendement maximum [$\text{mg}_{\text{lip}}.\text{g}_{\text{glu}}^{-1}$]
Azote	31.1%	139.0
Zinc	6.1%	33.4
Fer	23.3%	104.5
Phosphore	18.2%	97.5

Certains auteurs ont étudié l'influence du degré de limitation en azote, défini par le ratio entre le carbone et l'azote apportés lors de la culture. Tout d'abord, la concentration critique en azote extracellulaire en dessous de laquelle la levure *R. glutinis* semble être en limitation est de 0.02 g/L (Papanikolaou *et al.*, 1998). Par ailleurs, d'après Granger (Granger, 1992) l'accumulation lipidique est maximale quand le ratio C/N initial pour une culture en mode batch est proche de 80 $\text{g}_{\text{glucose}}.\text{g}_{\text{NH}_3}^{-1}$. Mais ce résultat obtenu est en mode batch c'est à dire sans contrôle du flux d'apport en carbone. En mode fed-batch, la productivité semble dépendre du RNR : le Relative Nitrogen Rate, est défini comme le rapport entre la vitesse spécifique de consommation de l'azote et sa valeur maximale : $\text{RNR} = \frac{q_N}{q_{N_{\text{max}}}}$. Lorsque la vitesse spécifique

de consommation de l'azote est contrôlée par l'apport limitant en azote, le RNR est synonyme d'un degré de limitation en azote imposé par le flux d'azote. L'évolution de la vitesse spécifique et du rendement de production de lipides en fonction du RNR permet d'identifier des intervalles de degré de limitation d'azote les plus propices à l'accumulation de lipides (Cescut, 2010). La valeur maximale de la vitesse spécifique d'accumulation de lipides apparait pour un RNR voisin de 14% avec une valeur maximale de 0.066 $\text{Cmol}_{\text{lip}}.\text{Cmol}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cependant, dans de telles conditions, la vitesse spécifique d'accumulation de lipides chute rapidement après quelques heures (3h en moyenne), Ce phénomène est probablement lié à l'incapacité pour la cellule d'assurer une synthèse protéique nécessaire au maintien de l'activité synthèse / stockage de lipides (Cescut, 2010).

La concentration en oxygène dissous

R. glutinis étant une levure aérobie stricte, l'ensemble de son fonctionnement est affecté lorsqu'elle se trouve en limitation en oxygène. Les résultats présentés dans le Tableau 7 mettent en évidence l'impact de la concentration en oxygène dissous sur le taux de croissance et le

rendement apparent de conversion du glucose en biomasse (Granger, 1992) lors de la culture de *R. glutinis*.

Tableau 7: Valeurs moyennes du taux spécifique de croissance et du rendement de conversion du glucose en biomasse observables avec *R. glutinis* avec différentes concentrations en oxygène dissous en réacteur agité glucose initial à 50g.L⁻¹, T : 30°C, pH 5.5 (Granger, 1992).

[O ₂] _{dissous} [%]	μ [h ⁻¹]	R _{S/X} [Cmol _X .Cmol _{glu} ⁻¹]
8.0 < [O ₂] _{dissous} < 20	0.260	0.69
0.4 < [O ₂] _{dissous} < 1.2	0.056	0.42

Ces résultats montrent l'importance de contrôler la concentration en oxygène dissous afin de cultiver la souche dans un environnement non limitant en oxygène c'est-à-dire avec une concentration en oxygène dissous supérieure à 20%.

Le pH

La croissance de *R. glutinis* est optimale dans un intervalle de pH compris entre 5,0 et 5,5 (Granger, 1992). L'impact du pH sur les vitesses et les rendements d'accumulation lipidique et sur le profil des lipides obtenus chez *Rhodotorula glutinis* a été mis en évidence (Johnson *et al.*, 1992, Granger, 1992) (Tableaux 8, 9, 10 et 22). Ainsi, la vitesse de synthèse des acides gras et le rendement de conversion du glucose en acides gras semblent être maximaux pour un pH de 5.5. Le rendement carbone semble augmenter avec le pH, jusqu'à la valeur de 0.55 g.g⁻¹ atteinte pour un pH de 7 ; au-delà, la croissance et la production sont inhibées. La vitesse de production croît également avec le pH jusqu'à la valeur-pallier de 5.5 où elle atteint un maximum de 0.28 mg.g_x⁻¹.h⁻¹.

Tableau 8 : Influence du pH sur les vitesses spécifiques de synthèse des AG et sur le rendement de conversion du glucose en AG en réacteur agité glucose initial à 50g.L⁻¹, T : 30°C, pH 5.5 (Granger, 1992)

pH	Vitesse de synthèse des acides gras (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹)	R _{S/X} (g.g ⁻¹)
3	0.22	0.4
4	0.25	0.46
5.5	0.28	0.55
7	0.20	0.55
8	0	0

Le pH ne semble pas impacter le profil lipidique : le composé majoritaire demeure l'acide oléique (environ 40%), pour un pH compris entre 3 et 6. Une acidification augmente cependant la proportion d'ergostérol qui passe de 3 à 12% pour un pH variant de 6 à 3 (Tableau 9).

Tableau 9 : Profil en acides gras et teneur en ergostérol de la souche *Rhodotorula glutinis* pour différents pH (Johnson *et al.*, 1992)

pH	14 :0	16 :0	18 :0	18 :1	18 :2	18 :3	Ergosterol
3	0.9	25.5	8.1	39.7	18.4	3.3	11.7
4	1.1	27.7	7.1	43.1	18.0	3.8	6.2
5	1.5	31.5	6.4	40.1	17.2	3.1	4.6
6	1.2	27.8	5.3	40.8	19.4	4.3	2.9

Les rendements et vitesse de synthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très semblables pour des pH allant de 3 à 5.5, ils connaissent par contre une diminution pour un pH supérieur à 5.5 (tableau 10).

Tableau 10 : Influence du pH sur les vitesses spécifiques de synthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) et sur le rendement de conversion du glucose en AGPI (Granger, 1992).

pH	Vitesse de synthèse des AGPI (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹)	R _{S/X} (g.g ⁻¹)
3	0.15	0.28
4	0.17	0.28
5.5	0.15	0.28
7	0.10	0.26
8	0	0

La vitesse de synthèse de l'acide α -linoléique (AAL) ou C18:3 et le rendement sont constants pour un pH compris entre 3 et 8, avec un petit pic de $0.07 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et 0.12 g.g^{-1} à pH 4 (Tableau 11).

Tableau 11 : Influence du pH sur les vitesses spécifiques de synthèse des AAL et sur le rendement de conversion du glucose en AAL (Granger, 1992).

pH	Vitesse de synthèse de l'acide α -linoléique ($\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	R _{s/x} (g.g^{-1})
3	0.06	0.11
4	0.07	0.12
5.5	0.06	0.11
7	0.05	0.12
8	0	0

La température

La température est un paramètre clé dans l'accumulation lipidique puisqu'elle influence à la fois la productivité de l'accumulation lipidique et le profil des acides gras accumulés. Ainsi, la productivité en acide α -linoléique par *Rhodotorula glutinis* est maximale à 15°C ($6.4 \cdot 10^{-4} \text{ Cmol}_{\text{C18:3}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et diminue avec la température ($3.9 \cdot 10^{-4} \text{ Cmol}_{\text{C18:3}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) à 30°C . Toutefois les acides gras saturés et monoinsaturés et triglycérides associés subissent une baisse de productivité importante (au moins -40%) (Granger *et al.*, 1993). Par ailleurs, la température semble influencer la longueur des chaînes aliphatiques des acides gras en modifiant l'activité des élongases. Chez *R. minuta*, une augmentation de la température de 30 à 32°C entraîne une diminution des longueurs de chaîne (Saxena *et al.*, 1998).

Selon Suutari (Suutari *et al.*, 1990), les levures « s'adaptent » aux changements de températures. Ces travaux concernent les changements de compositions des acides gras des souches *Candida oleophila*, *Candida utilis*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides* et *Saccharomyces cerevisiae* pour des températures d'incubation inférieures à 20°C et supérieures à 26°C . Les résultats de ces expérimentations démontrent que les mécanismes d'adaptation portant sur les acides gras varient en fonction des souches. Pour *S. cerevisiae*, *C. oleophila*, *C. utilis* et *L. starkeyi* la réponse à une modification de la température est un changement du nombre moyen de carbone des acides gras.

2.1.3. Le stockage des substances lipidiques

Les lipides neutres sont accumulés et stockés dans des organelles dérivés du réticulum endoplasmique appelés particules lipidiques (LP), gouttelettes lipidiques ou corps lipidiques (Figure 11). Les LP, qui ont récemment acquis le statut d'organelle, ne sont pas un simple compartiment de stockage, mais une structure dynamique qui participe activement au maintien de l'homéostasie lipidique.



Figure 11 : Photographie de *Rhodotorula glutinis* au microscope optique (OLYMPUS BH2, Japon)

2.1.3.1. Nature et composition des gouttelettes lipidiques

Les LP refferment un noyau hydrophobe de lipides neutres isolé du cytoplasme par une monocouche de phospholipides dans laquelle s'insèrent des protéines. Il a été montré chez *S. cerevisiae* que le protéome et le lipidome des LP répondent aux conditions environnementales et nutritionnelles. Il existe cependant une composition de base indépendante de ces conditions. Les protéines présentes dans la membrane du corps lipidique (49 à 81 protéines identifiées) seraient des protéines impliquées essentiellement dans le métabolisme des lipides et le transport cellulaire (Tableau 12). Ces protéines contribuent à l'activation des acides gras, à la synthèse de triacylglycérols et à leur dégradation (Sorgner and Daum, 2002, Athenstaedt *et al.*, 1999, Marr *et al.*, 2012). Ainsi, la composition lipoprotéique des corps lipidiques posséderait un rôle déterminant voire aussi important que la composition des lipides intrinsèques dans le fonctionnement de la cellule lors d'une phase d'accumulation de lipides.

Tableau 12 : Principales protéines des particules lipidiques et gènes les codant identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Athenstaedt *et al.*, 1999)

Nom du gène ou de l'ORF	Fonction de la protéine	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)
FAA1	Ligase pour les longues chaînes d'acides gras	77,866
FAT1	Activatrice des très longues chaînes d'acides gras ; protéine de transport des longues chaînes d'acides gras.	71,700
FAA4	Ligase longue chaîne d'acide gras Co-A	77,267
ERG7	Lanosterol synthase	83,318
YMR31313c	Inconnue	73,612
TGL1	Lipase TAG	62,979
ERG1	Epoxidase squalene	55,120
YBR177c	Famille UFP007 (non caractérisée) ; homologue faible d'un potentiel récepteur membranaire	51,255
YOR059c	Site actif lipase serine	51,114
YIM1	Homologue de la protéase de la membrane interne mitochondriale	41,651
ERG6	Sterol- Δ^{24} -methyltransferase	43,421
YDL193w	Homologue faible de la protéine canal du Ca ²⁺	42,555
TDH1	GADPH	35,619
TDH2	GADPH	35,715
TDH3	GADPH	35,615
YJU3	Lysophospholipase	35,549
YIM4	Oxidoreductase	32,822
YKR0456	inconnue	31,246

2.1.3.2. Mécanisme de formation des gouttelettes lipidiques.

Le mécanisme de formation des particules lipidiques (LP) fait partie du domaine de la recherche actuelle, bien que de récents progrès aient permis de donner des indications quant au déroulement de ce mécanisme. Un modèle de biogenèse des corps lipidiques propose que les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides accumulent des domaines spécifiques dans le réticulum endoplasmique, favorisant ainsi la biosynthèse des lipides neutres dans ces régions. Des microgouttelettes, précurseurs des corps lipidiques, sont formées entre les deux feuilletts de la double couche du réticulum endoplasmique. Après avoir atteint une taille suffisante, les corps lipidiques matures, chargés des protéines qui ont perdu leur domaine transmembranaire, se détachent du réticulum endoplasmique et bourgeonnent (Czabany *et al.* 2007). Il a par ailleurs été montré que l'accumulation de LP est induite par la présence de l'enzyme glycérol-3-

phosphate-acyltransférase, étant donné que des micro-organismes délétés des gènes codant cette protéine perdent leur capacité à former des corps lipidiques. Cette enzyme est impliquée dans la première étape de la synthèse des TAG. Elle catalyse le transfert d'un acide gras activé sur la position sn-1 du glycérol-3-phosphate pour produire l'acide lysophosphatidique (Figure 9). Cette protéine est codée par les paires de gènes suivants : GATP1/GPT2 et GAT2/SCT1, identifiés chez *S. cerevisiae*, elle existe donc sous deux isoformes dont le rôle dans la formation de particule lipidique serait fonction de l'environnement selon le modèle proposé par Marr *et al.* (Figure 12). Ainsi, le modèle propose un rôle différent pour Gat1p et Gat2p dans la synthèse des TAG et des LP en fonction de la nature de l'acide gras synthétisé (palmitate ou oléate) et de la présence ou non de glucose. L'absolue dépendance de la Gat1p en présence d'oléate pour la formation de LP a été mise en évidence en condition de croissance, tandis que le deuxième modèle, hypothétique, repose sur le fait que Gat2p est davantage impliquée pendant la phase stationnaire (Marr *et al.*, 2012).

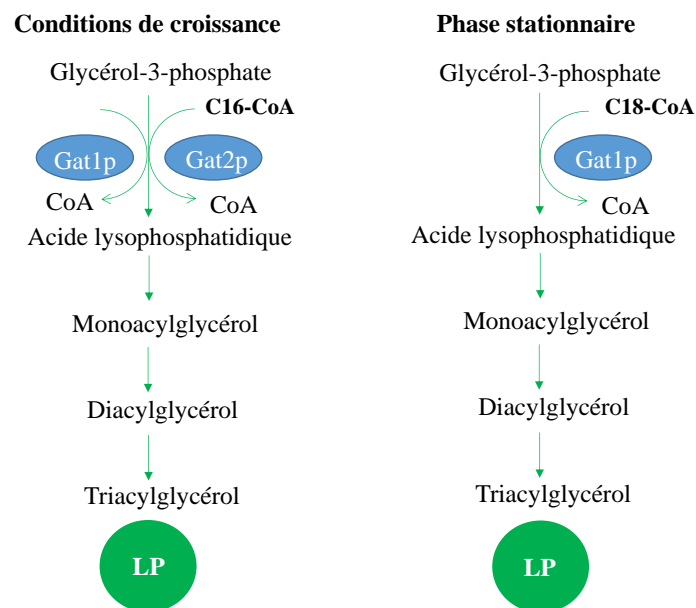


Figure 12 : Rôle des sous-unités de la glycérol-3-phosphate-acyltransférase, en fonction de l'environnement, dans la formation des particules lipidiques (Marr *et al.*, 2012).

2.2. L'accumulation de polysaccharides

L'accumulation de polysaccharides est un phénomène bien étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de son induction, parmi lesquelles une limitation nutritionnelle (Bocharova *et al.* 1975). Bien que ce phénomène soit très peu caractérisé chez les levures oléagineuses, la capacité de *R. glutinis* à accumuler des

sucres de réserve a toutefois été mise en évidence, en culture liquide ou encore lors de sa conservation sur boîte de Pétri à 4°C (Berthe *et al.* 1981, Gabier *et al.*, 2005).

Par ailleurs, chez *Rhodotorula glutinis* et *Yarrowia lipolytica* on observe la synthèse transitoire de polysaccharides lors la phase transitoire précédant l'accumulation de lipides qui est suivie d'une phase de reconsommation des polysaccharides au profit de l'accumulation lipidique (Cescut, 2009, Cescut *et al.*, 2014). D'une manière similaire, chez *S. cerevisiae* une limitation nutritionnelle en azote ou en phosphore provoque une accumulation de tréhalose et de glycogène (Bocharova *et al.* 1975). Cependant, l'accumulation de ces polysaccharides est maintenue pendant toute la limitation nutritionnelle chez *S. cerevisiae* (Lillie, 1980) alors qu'elle demeure transitoire chez *R. glutinis* et *Y. lipolytica*, probablement de par l'effet de la limitation en carbone appliquée lors de la phase d'accumulation lipidique (Granger, 1993 ; Cescut, 2009). Une limitation nutritionnelle doublée d'une limitation en carbone chez *S. cerevisiae* en mode oxydatif entrainerait probablement une reconsommation de ces substances de réserve.

Evans et Ratledge ont mis en évidence l'interrelation entre la synthèse de lipides et de polysaccharides chez *Rhodospiridium toruloides* : en fonction de la source d'azote utilisée dans une culture en mode batch, une fois la limitation mise en place, la composition macromoléculaire diffère. Ainsi, le chlorure d'ammonium favoriserait l'accumulation de polysaccharide au détriment des lipides, et vice-versa pour le glutamate (Evans et Ratledge, 1984). D'une manière générale, la diminution de l'apport en azote limite les capacités de la levure à synthétiser les protéines et l'ARN nécessaires à la formation de biomasse catalytique et dérégule les enzymes participant à la glycolyse (Anastassiadis and Rehm 2006, Zhu *et al.*, 2012). Cette dérégulation associée à un ralentissement de l'assimilation du carbone vers la biomasse catalytique engendre une réorientation non contrôlée du carbone passant par la glycolyse, qui pourrait expliquer, à court terme, un overflow vers la synthèse polysaccharidique.

2.3. Voie de synthèse des caroténoïdes.

La synthèse des caroténoïdes se fait en trois principales étapes :

- La conversion d'acétyl-coA en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), catalysée par la HMG-CoA synthase, puis en acide mévalonique (MVA). Deux phosphorylations successives mènent à l'acide mévalonique pyrophosphate. Le mévalonate pyrophosphate subit ensuite une décarboxylation à l'origine de la formation d'isopentenyl pyrophosphate (IPP).
- L'IPP est ensuite isomérisé en diméthylallyl phosphate (DMAPP) et est suivi par des condensations successives entre ces deux molécules. Le premier intermédiaire issu de cette condensation est le géranyl pyrophosphate (GPP) qui est à l'embranchement de la synthèse des monoterpènes. La condensation d'une nouvelle molécule d'IPP avec le GPP donne lieu à la formation de farnesyl pyrophosphate (FPP). Ce composé est le précurseur d'une multitude d'isoprénoïdes différents (bactériochlorophylles, ubiquinones, hopanoïdes, stérols etc...) et également des caroténoïdes en C₃₀, les apocaroténoïdes. La réaction suivante dans la voie générale de biosynthèse des isoprénoïdes est la synthèse de géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP) qui résulte de la condensation d'un IPP avec le FPP sous l'action de la GGPP synthase. Le GGPP est le dernier composé commun à la voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes et des caroténoïdes.
- La réaction suivante est la première réaction spécifique à la branche caroténogène du métabolisme des isoprénoïdes. Deux molécules de GGPP sont condensées sous l'action de la phytoène synthase pour former du phytoène, premier composé C₄₀ considéré comme un caroténoïde malgré son absence de couleur. C'est la désaturation et la cyclisation du phytotène par étapes successives qui permet la synthèse de neurosporène, lycopène, γ -carotène, β -carotène, torulène et astaxanthine. (Hernandez-Almanzaa *et al.*, 2014 ; Savy, 2005)

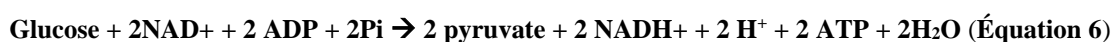
3. Catabolisme des substances carbonées de la levure oléagineuse *Rhodotorula glutinis*.

L'assimilation des substances osidiques d'intérêt se fait soit par la voie glycolytique (glucose, glycérol), soit par la voie des pentoses (xylose), voies qui conduisent à la production d'acide pyruvique dans le cytoplasme. Ce dernier est ensuite transloqué dans la mitochondrie pour être transformé en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase qui entre ensuite dans le cycle des acides tricarboxyliques.

3.1. Le métabolisme central.

3.1.1. La glycolyse

L'assimilation du glucose se fait par la voie glycolytique dite aussi voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, qui génère de l'ATP et du pouvoir réducteur (NADH) (Figure 13). Hormis les réactions faisant intervenir les activités glucokinase, phosphofructokinase et pyruvate-kinase, les réactions de la glycolyse sont réversibles. Le glucose entre dans la glycolyse après une phosphorylation par une hexokinase. L'hexokinase est fortement inhibée par le tréhalose-6-phosphate. La phosphoglucose isomérase convertit le glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. La phosphofructokinase catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. La fructose-1,6-biphosphate aldolase clive le fructose-1,6-biphosphate en dihydroxyacétone-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate. La triose-phosphate-isomérase permet l'interconversion entre le dihydroxyacétone-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate. La glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase catalyse l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3 biphosphoglycérate en générant une liaison enrichie en énergie acyl-phosphate. La phosphoglycérate kinase permet d'utiliser la liaison riche en énergie acyl-phosphate du 1,3 biphosphoglycérate pour produire une molécule d'ATP. La phosphoglycérate mutase catalyse l'interconversion entre le 3- et le 2-phosphoglycérate. L'énolase catalyse la déshydratation du 2-phosphoglycérate en phospho-énol-pyruvate. Enfin, la pyruvate-kinase catalyse la deuxième réaction formant de l'ATP en formant du pyruvate. Le bilan de la glycolyse est décrit par l'équation 6.



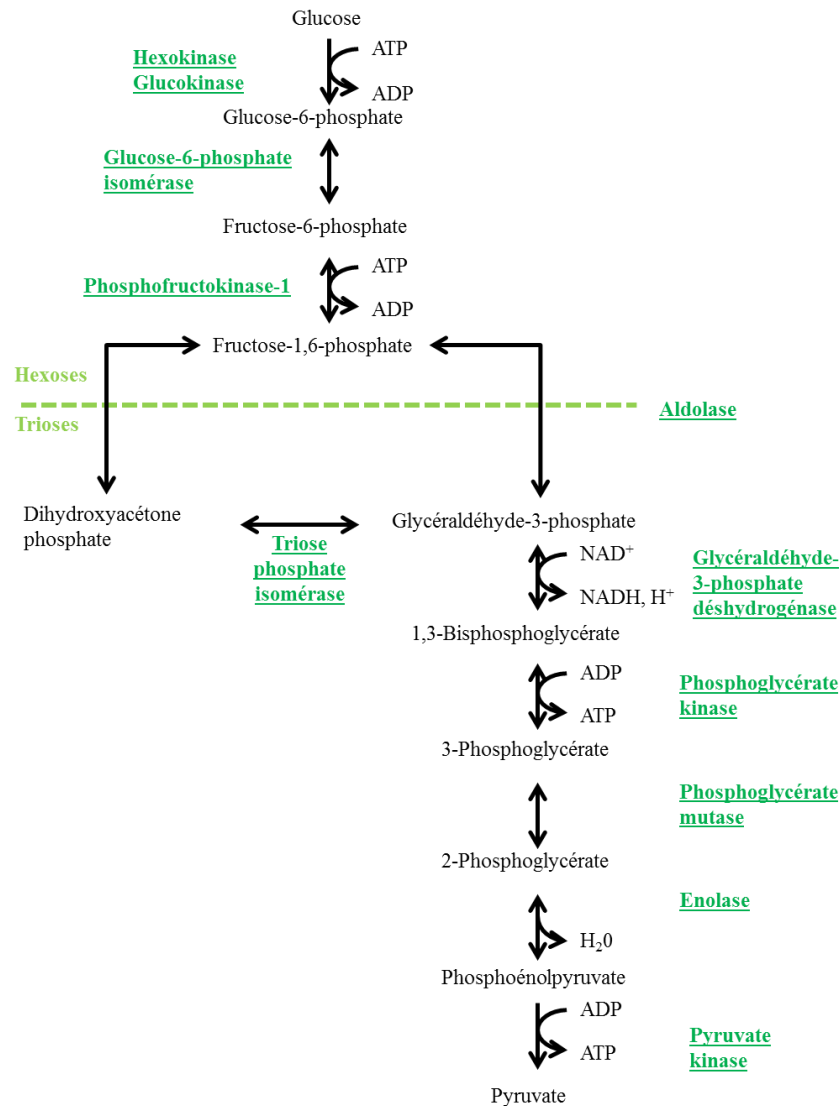


Figure 13: Voie Embden-Meyerhof-Parnas chez la levure.

3.1.2. Le pyruvate, carrefour métabolique.

A l'issue de la glycolyse, le pyruvate subit généralement une décarboxylation oxydative catalysée par une pyruvate-déshydrogénase, multi-enzyme mitochondriale qui contient trois fonctions : pyruvate-déshydrogénase, dihydrolipoamide-acétyl-transférase et dihydrolipoamide-déshydrogénase. Cette réaction produit du CO_2 , une molécule d'eau, une molécule de NADH, H^+ et une molécule d'acétyl-CoA afin d'alimenter le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA peut aussi être formé dans le cytosol via le pyruvate « by-pass », grâce à l'action de la pyruvate-décarboxylase, de l'aldéhyde déshydrogénase et de l'acétyl-CoA-synthétase (Figure 14). Cette voie existe chez plusieurs levures dont certaines souches du genre *Candida* (Chen *et al.*, 2005) et a été mise en évidence chez *Rhodospiridim toruloïdes* (Zhu *et al.*, 2012).

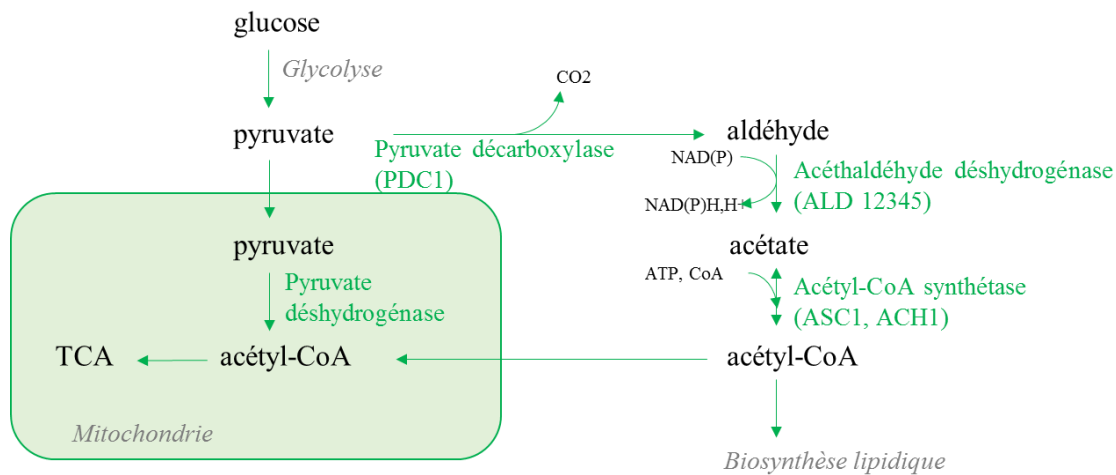


Figure 14 : Pyruvate bypass (Remize *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2012).

3.1.3. Le cycle de Krebs.

L'acétyl-CoA est formé soit à partir de la décarboxylation du pyruvate, soit via le pyruvate by-pass, soit issu de la voie de dégradation des acides gras rejoint le cycle de Krebs, ou cycle des acides tricarboxyliques qui se déroule dans la mitochondrie (Figure 15). Tout d'abord, le citrate est formé par condensation de l'acétyl-CoA avec une molécule d'oxaloacétate. Une molécule d'eau est consommée et un coenzyme A-SH est relargué. Le citrate produit est isomérisé en isocitrate, lui-même oxydé et décarboxylé pour former une molécule d' α -cétooglutarate. Un NAD^+ est réduit et une molécule de CO_2 est formée. L'isocitrate déshydrogénase, NAD^+ dépendante, est inhibée par le NADH, même à de faibles concentrations (Morgunov *et al.*, 2004). L' α -cétooglutarate subit une décarboxylation oxydative pour former une molécule de succinyl-CoA avec réduction du NAD^+ . Cette molécule est transformée en succinate en produisant une molécule d'ATP et un CoA-SH. Le succinate est oxydé en fumarate avec réduction d'un FAD. Le fumarate est hydraté en malate, ce qui consomme une molécule d'eau. Le malate est oxydé en OAA, ce qui réduit une molécule de NAD.

Le shunt du glyoxylate permet de produire du glyoxylate et du succinate à partir de l'isocitrate. Le glyoxylate sera ensuite condensé avec une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'eau pour former du malate et libérer un CoA-SH. Deux enzymes sont caractéristiques de ce cycle : l'isocitrate lyase et la malate synthase. L'isocitrate lyase, codée par le gène ICL1 chez *S. cerevisiae*, catalyse le clivage de l'isocitrate en succinate et glyoxylate. La malate synthase catalyse la condensation du glyoxylate avec une molécule d'acétyl-CoA.

Ainsi, le cycle de Krebs permet de générer du pouvoir réducteur, en formant des molécules de NADH à partir de NAD⁺ et de former des métabolites intermédiaires, précurseurs des réactions de biosynthèse.

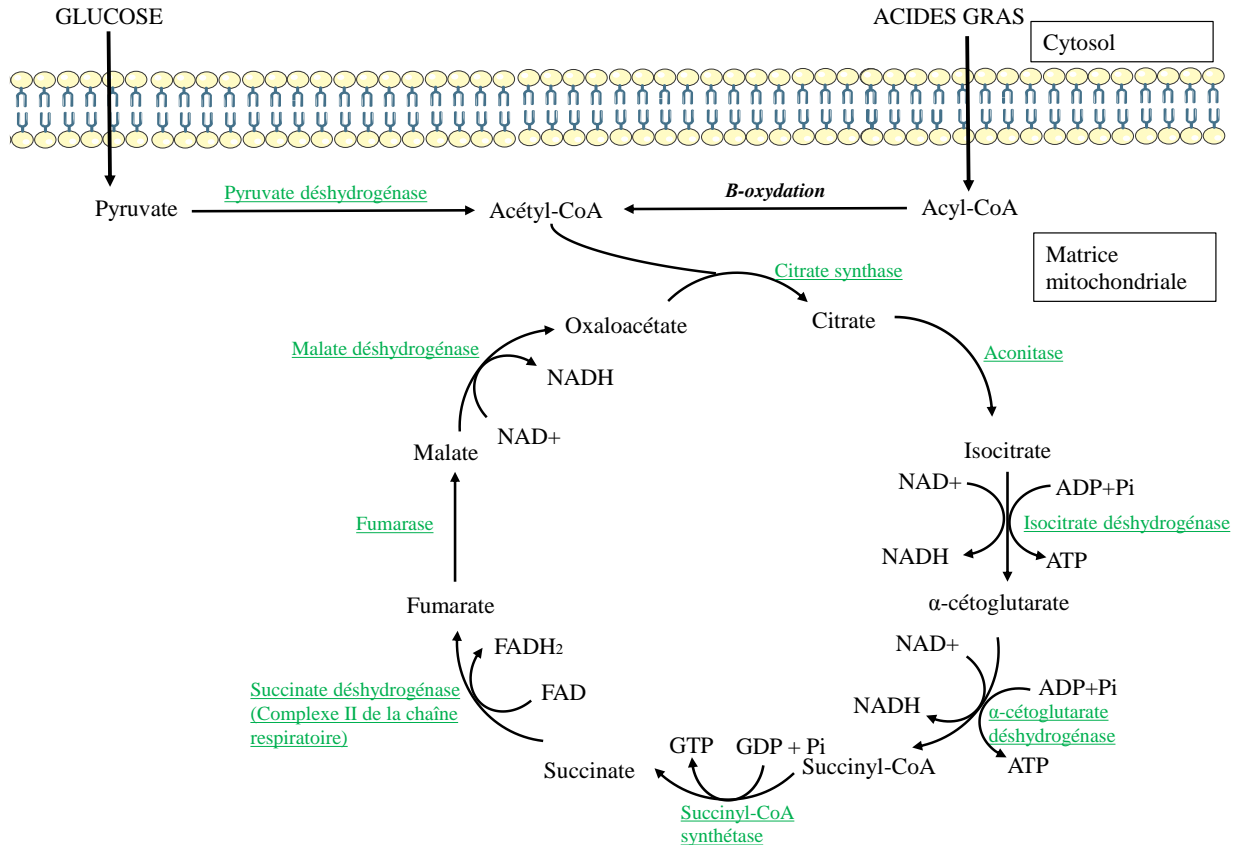


Figure 15: Le cycle de Krebs.

3.1.4. La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative.

La chaîne respiratoire est constituée de complexes protéiques localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle constitue, couplée à l'ATP synthétase, la phosphorylation oxydative. Ce processus associe l'oxydation du NADH et du FADH₂ à la production d'ATP. La chaîne de transport d'électrons se compose des quatre complexes protéiques suivants : NADH ubiquinone oxydoréductase (appelé aussi complexe I), succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II), ubiquinol cytochrome C oxydoréductase (complexe III), cytochrome C oxydase (complexe IV). À ces complexes protéiques, s'ajoutent des transporteurs mobiles d'électrons, l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome C (Figure 16).

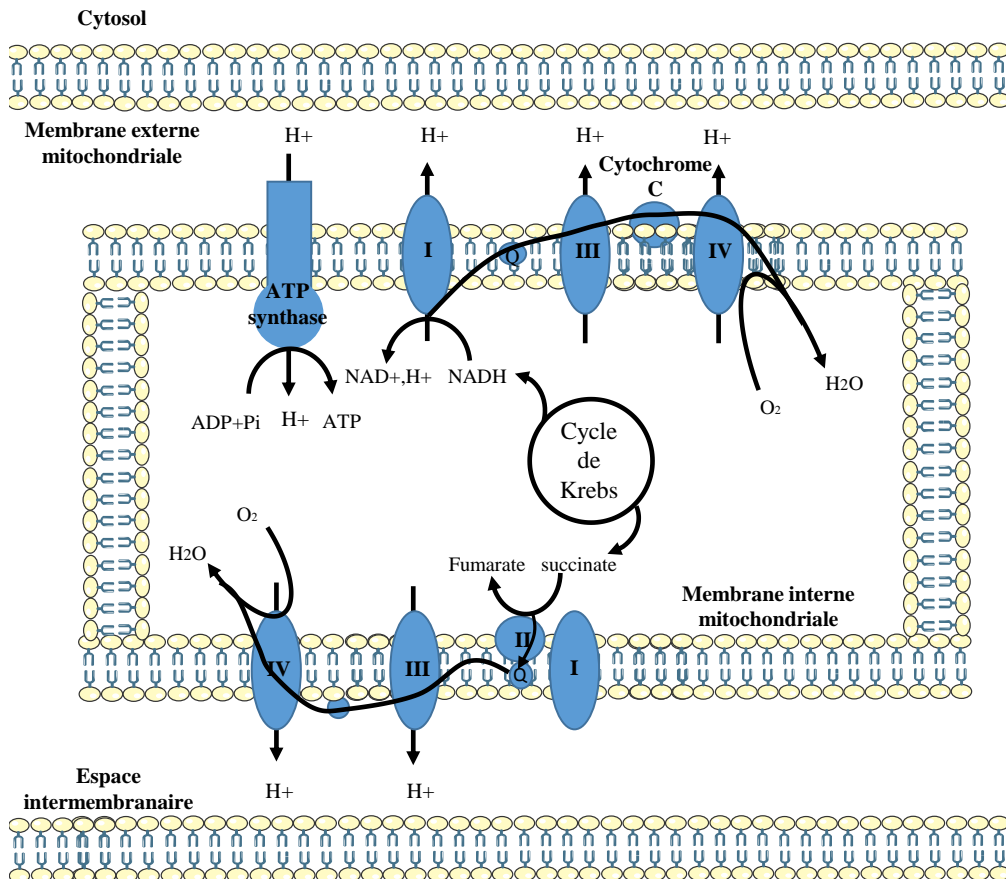


Figure 16 : La phosphorylation oxydative

Le NADH cède ses électrons au complexe I et ils sont ensuite transportés par l'ubiquinone jusqu'au complexe III. Enfin les électrons sont pris en charge par le cytochrome c puis libérés au niveau du complexe IV où ils sont utilisés pour la réduction de l'oxygène en eau. Le FADH₂ cède, quant à lui, ses électrons au complexe II. Ils sont ensuite transportés par l'ubiquinol jusqu'au complexe III et suivent alors le même chemin que les électrons fournis par le NADH. Ainsi, la chaîne respiratoire permet le transfert progressif des électrons à partir des coenzymes réduits vers l'oxygène par une cascade d'oxydoréduction. L'énergie libérée au cours de ce transfert d'électrons sur la chaîne d'oxydoréduction permet l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, au niveau des complexes I, III et IV, formant ainsi un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Ce couplage chimiosmotique aboutit à la formation d'un gradient électrochimique qui contient l'énergie d'oxydation. Ce gradient est constitué d'un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et d'un gradient de charges (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement). Ce gradient électrochimique, via le retour des protons dans la matrice en passant par l'ATP synthase, permet à celle-ci de catalyser la réaction réversible de phosphorylation de l'ADP en ATP. La consommation d'oxygène et la phosphorylation sont ainsi couplées via cette force protomotrice.

Une molécule de NADH réoxydée permet ainsi de libérer 10 protons, une molécule de FADH₂ permet le transport de 6 protons. Les protons exportés permettent le maintien du potentiel transmembranaire entre l'espace intermembranaire et la matrice de la mitochondrie. Ainsi, l'entrée de protons à l'intérieur de la mitochondrie permet la synthèse d'ATP grâce à l'ATPase membranaire. Les 10 protons du NADH permettront une synthèse théorique de 3 ATP et les 6 protons du FADH₂ de 2 ATP.

3.2. Le catabolisme du xylose.

3.2.1. Transport du xylose.

La première étape de la fermentation des sucres par les levures est leur transfert dans la cellule à travers la membrane plasmique. Or, plusieurs travaux ont montré qu'il s'agissait d'une étape limitante dans l'assimilation du xylose (Salusjärvi *et al.*, 2008 ; Stambuk *et al.*, 2003). Les levures métabolisant naturellement le xylose ont généralement deux types de transporteurs pour le xylose : l'un passif non spécifique à faible affinité et l'autre actif spécifique à haute affinité dont la synthèse est inhibée par le glucose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007, Jeffries *et al.*, 2004). La présence de ces deux types de transporteurs a été mise en évidence chez *Candida boidinii*, *Candida intermedia*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia stipitis*, *Candida succiphila* et *Kluyveromyces marxianus* (Gárdonyi *et al.*, 2003b, Kilian *et al.*, 1988, Stambuk *et al.*, 2003). La répression catabolique ou l'inactivation du système à forte affinité par le glucose semble être un phénomène général chez les levures présentant ces deux systèmes de transport (Kilian *et al.*, 1988).

3.2.2. Premières étapes du métabolisme du xylose.

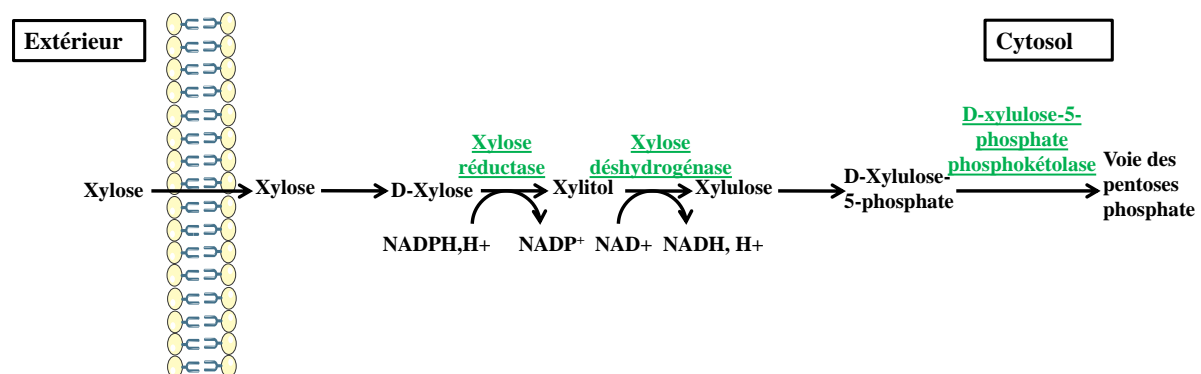


Figure 17 : Etapes de transformations du xylose au xylulose chez *Rhodotorula glutinis*.

Une fois le xylose transporté dans la cellule, il est converti en D-xylose sous l'action de la xylose isomérase. Les premières étapes du catabolisme du xylose diffèrent chez les levures et les bactéries. Chez les levures, le D-xylose est réduit en xylitol par une xylose réductase (XR) NAD(P)H dépendante. Le xylitol est un coproduit bien identifié du catabolisme du xylose. Ainsi, il est excrété dans le milieu lors de la mise en œuvre de cultures levuriennes utilisant le xylose en simple ou co-substrat associé au glucose (Slininger *et al.*, 1985, Kötter *et al.*, 1993, Zikou *et al.*, 2013, Erdei *et al.*, 2013). Le xylitol est ensuite oxydé en xylulose par une xylitol-déshydrogénase-NAD-dépendante. Le xylulose est ensuite phosphorylé par une xylulokinase pour former du xylulose-5-phosphate, qui est ensuite acheminé dans le cycle des pentoses phosphate (Evans et Ratledge, 1984, Kötter *et al.*, 1993, Jeffries *et al.*, 2006) (Figure 17). Ainsi, trois principales enzymes jouent un rôle-clé dans la conversion du D-xylose en D-xylulose-5-phosphate : la xylose réductase, la xylitol déshydrogénase et la D-xylulose-5-phosphate phosphokétolase. L'activité de la XR nécessite l'oxydation d'un cofacteur. L'affinité de l'enzyme pour le NADH ou le NADPH est variable selon les micro-organismes. La XR identifiée chez *R. toruloïdes* préférerait le cofacteur NADPH au cofacteur NADH d'un facteur 100 (Suomalainen *et al.*, 1989 ; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Ce besoin de régénération ou d'inter-conversion en cofacteurs, traduit par la disponibilité en NADPH, est un des verrous à l'entrée du xylose dans le métabolisme cellulaire (Kötter *et al.*, 1993, Gurpilhares *et al.*, 2008, Freer *et al.*, 1997 ; Grotkjaer *et al.*, 2005) La xylitol déshydrogénase (XDH) catalyse la réaction de transformation du xylitol en D-xylulose. Il s'agit probablement d'une métalloprotéine. C'est un tétramère dont les sous unités sont de 45 KDa. Son pH optimum est compris entre 7.5 et 8.5 et elle utilise comme cofacteur le NAD^+ exclusivement (Salusjärvi *et al.*, 2008). La phosphokétolase catalyse la réaction de phosphorylation du D-xylulose en D-xylulose-5-phosphate, intermédiaire de la voie des pentoses phosphate. Il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre l'activité phosphokétolase et la production de biomasse à partir de xylose (Evans *et al.*, 1984).

Ainsi, de nombreux verrous contrôlent les premières réactions de transformation du xylose : ils s'articulent principalement autour des besoins en cofacteurs, et sont stœchiométriques, d'une part, puisque nécessaires aux activités enzymatiques, mais aussi dynamiques, de par la répartition et la disponibilité intracellulaire des cofacteurs corrélée à leur interconversion. Ils reposent également sur les flux de carbone intracellulaire. La saturation de la voie des pentoses est un exemple dynamique pouvant limiter le catabolisme du xylose.

3.2.3. La voie des pentoses phosphate.

La voie des pentoses phosphate (PPP) est la route biochimique pour le métabolisme des sucres en C5, dont le xylose. Elle se déroule dans le cytoplasme. On la retrouve chez tous les micro-organismes, puisqu'elle permet la synthèse d'intermédiaires métaboliques tels que le D-ribose-phosphate, le D-érythrose-phosphate et de pouvoir réducteur. Ainsi, quelle que soit la source de carbone consommée par le micro-organisme, 20 à 25% du carbone consommé est métabolisé via la PPP pour générer les précurseurs indispensables à la croissance (Evans *et al.*, 1985). La PPP comprend deux principales phases. La phase oxydative est la transformation du D-glucose-6-Phosphate en D-ribulose-5-Phosphate, tandis que la phase non oxydative est la conversion de du D-ribulose-5-Phosphate en ribose-5-Phosphate, D-xylulose-5-P, D-septoheptulose-7-Phosphate, D-erythrose-4-Phosphate, D-fructose-6-Phosphate et D-glycéraldéhyde-3-Phosphate (Kötter *et al.*, 1993) (Figure 18).

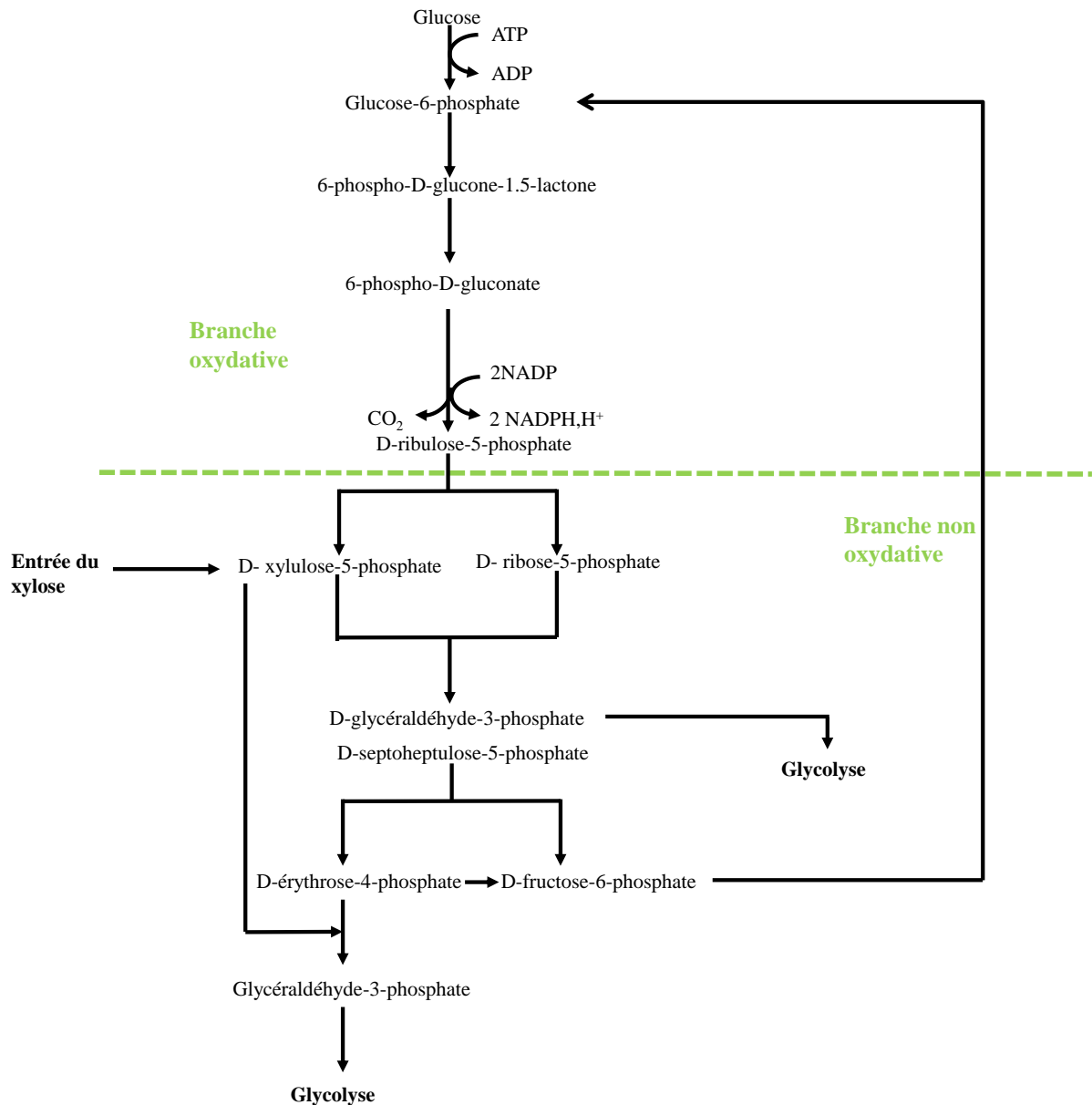


Figure 18: Réactions impliquées dans la voie des pentoses-phosphate.

3.3. Le catabolisme du glycérol.

3.3.1. L'entrée du glycérol dans la cellule.

Le transport transmembranaire du glycérol est la première étape de l'assimilation du glycérol. Alors que l'utilisation des sucres nécessite l'existence de systèmes de transport, les composés neutres à deux ou trois atomes de carbone, dont le glycérol fait partie peuvent traverser la membrane levurienne par simple diffusion. Plusieurs systèmes de transport du glycérol ont cependant été identifiés chez *S. cerevisiae* (Figure 19).

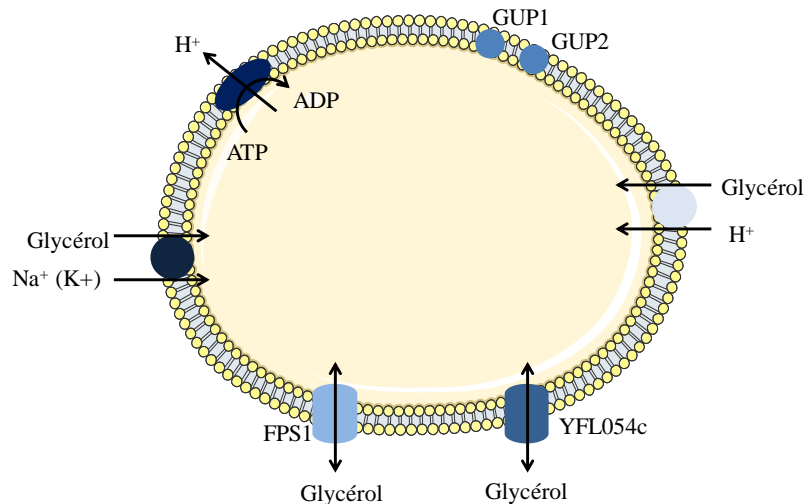


Figure 19: Les différents transporteurs du glycérol identifiés chez la levure.

La protéine Fps1 est une perméase de la famille des Major Intrinsic Proteins (MIP). Ce canal permet l'export de glycérol, lors d'un choc hypo-osmotique et se ferme lors d'un choc hyper-osmotique (Bill *et al.*, 2001). Il s'agit du principal transporteur impliqué dans la diffusion du glycérol (Luyten *et al.*, 1995). Un autre canal semble être impliqué dans la diffusion du glycérol, mais dans une moindre mesure, il s'agit de la protéine YFL054c (Oliveira *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été mis en évidence l'existence d'un symport H^+ /glycérol, dont l'expression est réprimée par le glucose et inductible dans des conditions néoglucogéniques ou dans des conditions de stress salin (Sutherland *et al.*, 1997). Un autre type de transporteur décrit fait intervenir les protéines GUP1 et GUP2 (Holst, 2000), mais leur fonctionnement est encore mal connu. Un système de transport actif en condition de stress osmotique, de type symport sodium/glycérol spécifique et constitutif, capable d'accepter le potassium comme co-substrat, a été mis en évidence chez *Debaryomyces hansenii* et chez *Zygosacharomyces rouxii* (Neves *et al.*, 2004, Lucas *et al.*, 1986, Lages *et al.*, 1999).

3.3.2. Les voies métaboliques de consommation du glycérol.

Chez *S. cerevisiae*, le catabolisme du glycérol se fait en deux étapes : une phosphorylation catalysée par une enzyme glycérol kinase, suivie d'une déshydrogénation catalysée par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Figure 20).

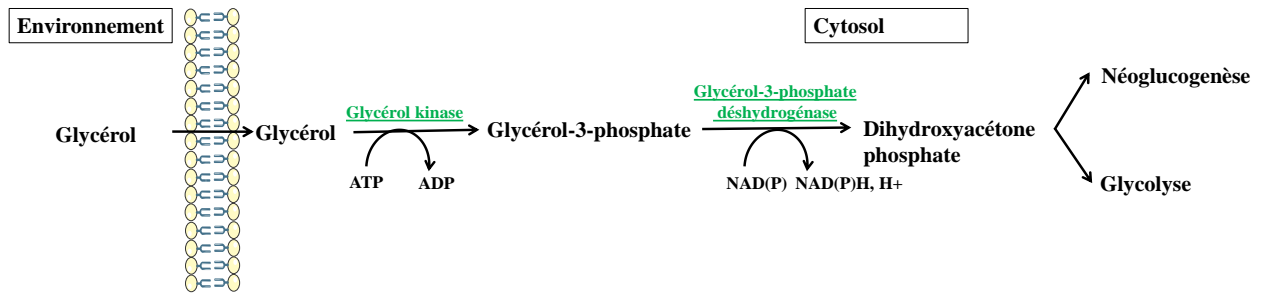


Figure 20 : Catabolisme du glycérol

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase peut-être NAD ou NADP dépendante. Chez *Rhodospiridium toruloides*, elle est exclusivement NAD-dépendante.

3.4. Le catabolisme des acides gras : la beta-oxydation.

3.4.1. Activation des acides gras

L'activation des acides gras est réalisée par une acyl-CoA synthétase II (ACS). Elle est localisée dans les peroxysomes et est induite par la présence de palmitate (Dellangelica *et al.* 1992). Lors de cette étape, l'acide gras réagit avec une molécule d'ATP pour former un acyl-adénylate. Ensuite, l'acyl-adénylate réagit avec un coenzyme A pour former une molécule d'acyl-CoA, ce qui forme une molécule d'AMP.

3.4.2. Dégradation des acides gras

La dégradation des acides gras est réalisée via la voie de la β -oxydation. Chez les levures, elle se situe uniquement dans les peroxysomes car elles n'ont pas les enzymes requises pour la β -oxydation mitochondriale (Hiltunen *et al.* 1993). Cette voie permet la formation d'acétyl-CoA à partir d'acides gras à chaîne paire et de propionyl-CoA à partir d'acides gras à chaîne impaire. Pour chaque molécule d'acétyl-CoA produite (ou de propionyl-CoA), une molécule de NADH₂ et une molécule de FADH₂ sont formées (Figure 21). L'acide gras à n carbones est dégradé de manière cyclique. Chaque cycle libère un acide gras raccourci de 2 carbones et une molécule d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA généré est ensuite catabolisé dans le cycle de Krebs.

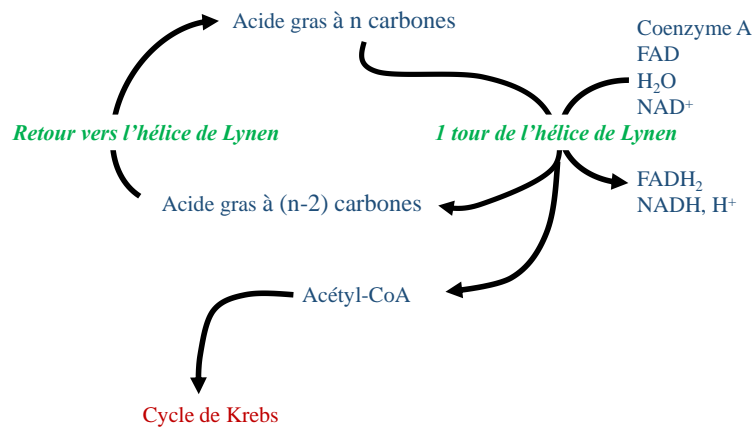


Figure 21 : Hélice de Lipoxygenase

La β -oxydation comprend quatre étapes :

- L'acyl-CoA formé lors de l'activation de l'acide gras est oxydé par une molécule de FAD pour former une molécule de trans- Δ^2 -enoyl-CoA grâce à l'action d'une acyl-CoA oxydase codée par les gènes POX 1 à 6 chez *Y. lipolytica* (Nicaud *et al.* 1998; Wang *et al.* 1999). Le peroxyde d'oxygène produit par cette réaction est détecté par la catalase peroxysomale codée par le gène CTA1 chez *S. cerevisiae* (Cohen *et al.* 1985; Cohen *et al.* 1988). Chez *Y. lipolytica*, l'acyl-CoA oxydase 2 est spécifique des acides gras à chaîne longue (Luo *et al.* 2002) et l'acyl-CoA oxydase 3 des acides gras à chaîne courte (Wang *et al.* 1999). Les acyl-CoA oxydases seraient importées dans les peroxysomes sous la forme d'un hétéropentamère (Titorenko *et al.* 2002).
- Le trans- Δ^2 -enoyl-CoA est hydraté par la 2-enoyl-CoA hydratase.
- Le L-3-hydroxyacyl-CoA formé est oxydé par un NAD⁺ pour former une molécule de 3-oxoacyl-CoA thioester.
- Le 3-oxoacyl-CoA thioester est clivé par une 3-oxoacyl-CoA thiolase codée par le gène POT1 (Igual *et al.*, 1992). Un coenzyme A est ajouté pour former un acétyl-CoA et un acyl-CoA diminué de deux carbones.

Le pouvoir réducteur nécessaire à ces réactions (NADH) est produit par une activité isocitrate déshydrogénase peroxysomale inductible par l'acide oléique et codée par le gène

IDP3 (Van Roermund *et al.* 1995). Les acides gras insaturés sont dégradés de la même manière que les acides gras saturés. Cependant, des enzymes sont spécifiques des acides gras cis-insaturés en position impaire tel que l'acide oléique 18 :1 Δ 9. L'intermédiaire formé est le 2,5 di-énoyl-CoA. Après un cycle d'oxydation, une double liaison 3-cis est formée et isomérisée par une Δ 3-cis- Δ 2-trans-énoyl-CoA isomérase. Par ailleurs, d'autres enzymes permettent d'oxyder les acides gras cis-insaturés en position paire en formant du 2-trans-4-cis-disénoyl-CoA. Celui-ci est oxydé en 3-énoyl-CoA par une 2,4-diénoyl-CoA réductase (NADPH dépendante). Une isomérisation intervient pour former du 2-énoyl-CoA par l'action de la Δ 3-cis- Δ 2-trans-énoyl-CoA isomérase.

- Exportation de l'acétyl-CoA vers les voies du métabolisme intermédiaire

Van Roermund *et al.* ont décrit deux voies d'exportation de l'acétyl-CoA à partir des peroxysomes. L'acétyl-CoA peut être transporté dans les mitochondries en tant qu'acétyl-carnitine grâce à l'action d'une acétyl-carnitine acyl-transférase codée par le gène CAT2. Elle est localisée dans les peroxysomes et les mitochondries. Mais, l'acétyl-CoA peut aussi être métabolisé en entrant dans le cycle du glyoxylate dans les peroxysomes. Deux molécules d'acétyl-CoA produisent 4 unités de carbone. Les intermédiaires incluent l'isocitrate et le succinate qui peuvent être importés dans les mitochondries (Van Roermund *et al.*, 1995).

- Induction des gènes par les acides gras

L'expression des protéines peroxysomales et des enzymes de la β -oxydation est régulée de plusieurs manières, principalement au niveau transcriptionnel (Latruffe *et al.*, 2001). La plupart de ces gènes sont réprimés en présence de glucose. L'utilisation d'éthanol ou de glycérol comme substrat entraîne une faible augmentation de l'expression de ces gènes. L'acide oléique permet l'augmentation forte de leur expression. Les protéines qui lèvent la répression de ces gènes sont *adr1p* et *snf1p*. Elles sont nécessaires à l'induction par l'acide oléique de protéines peroxysomales (Navarro and Igual, 1994). Les promoteurs de nombreux gènes codant des protéines peroxysomales présentent une séquence d'activation. Cette séquence est responsable de la régulation de la transcription par l'oléate doublée d'un élément de réponse à l'oléate « Oleate Response Element » (ORE) (Einerhand *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). Le motif de cette séquence a été définie comme étant CGG-N15-18-CCG (Rottensteiner *et al.*, 1996) ou CGGNNNTNA-N9-12-CCG (Karpichev and Small, 1998). L'activation de la transcription est

due à la fixation d'un complexe de dimères activateurs à l'élément ORE (Einerhand *et al.*, 1993).

4. Demande anabolique de la souche *Rhodotorula glutinis*

4.1. Composition macro-moléculaire

La composition macro-moléculaire de la souche *Rhodotorula glutinis* est variable en fonction du métabolisme et des conditions de culture. La composition en lipides en condition de croissance a été déterminée chez la souche d'intérêt et les résultats révèlent des différences : Zhu *et al.* ont déterminé 22.8% de lipides totaux lors de la culture de *Rhodospiridium toruloides* sur milieu minéral et substrat glucose en culture continue, Zhang *et al.*, ont évalué le pourcentage de lipides à 5% chez *Rhodotorula glutinis* en culture batch substrat glucose en conditions de croissance, Yang *et al.*, ont quant à eux quantifié à 10% la teneur en lipides de *Rhodospiridium toruloides* en fin de phase de croissance lors d'une culture sur substrat glucose (Zhu *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2014).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'impact de la source de carbone sur la composition macromoléculaire a été étudiée (Tableau 13) : la consommation de glycérol augmente de 5% la teneur en polysaccharides (Cortassa *et al.*, 1995). Il est intéressant de souligner que la source de carbone peut donc influencer la composition macromoléculaire des levures.

Tableau 13 : Composition macro-moléculaire de *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur différents substrats

Macromolécule/Source de carbone (%)	Glucose	Glycérol
Protéine	50.8 +/- 0.5	49.5 +/- 0.4
ARN	12.1 +/- 0.3	9.6 +/- 0.5
Polysaccharides	31 +/- 5	36 +/- 5
Lipides	4 +/- 6	3 +/- 6
Cendres	2-4	2-4

4.2. Pouvoir réducteur, accumulation de lipides et substrats carbonés.

Outre la synthèse d'acétyl-CoA via l'ATP citrate lyase qui leur est spécifique, les micro-organismes oléagineux se distinguent des autres par leur capacité à régénérer le pouvoir réducteur. Le pouvoir réducteur fourni par le NADPH est en effet essentiel pour réduire les

groupes acétyl en chaînes acyls d'acides gras. Pour chaque cycle de synthèse d'un acide gras, deux moles de NADPH sont nécessaires soit pour un acide gras en C18 16 moles de NADPH. Même si la régénération de NADPH chez les organismes oléagineux est aujourd'hui encore à l'étude, l'enzyme malique NADP⁺ dépendant semble être la principale source fournissant le pouvoir réducteur, ce qui en fait le point métabolique-clé de la synthèse lipidique (Ratledge, 2014). Ainsi, le clonage et la surexpression des gènes de *Mucor circinelloides* codant l'enzyme malique chez *Rhodotorula glutinis* ont permis de doubler l'accumulation lipidique de la souche (Li *et al.*, 2013). La synthèse lipidique sous forme de TAG se déroule dans le cytoplasme où pour une mole d'acétyl-CoA deux moles de NADPH sont nécessaires ; cela suggère que l'enzyme malique ne peut fournir l'ensemble du pouvoir réducteur requis étant donné que le NADPH provient du NADH et qu'une seule mole de NADH est produite par mole d'acétyl-CoA. La seconde source de pouvoir réducteur serait donc la voie des pentoses phosphates, mais cette hypothèse, chez ce micro-organisme, n'a jamais été ni confirmée ni réfutée (Ratledge, 2014). Par ailleurs, chez *Rhodospiridium toruloides*, la mesure des flux de carbone par marquage au carbone 14 a révélé à 72% - 28% les pourcentages respectifs de carbone métabolisé dans la glycolyse et dans la voie des pentoses phosphates (Evans et Ratledge, 1984). Alors que la régénération de pouvoir réducteur est au cœur des capacités d'accumulation de TAG, elle détermine aussi la capacité de consommation du xylose : la xylose-réductase NADPH-dépendante convertit ainsi le D-xylose en xylitol qui via la xylose-déshydrogénase NAD⁺ dépendante est transformé en xylulose. L'utilisation de xylose pour la synthèse lipidique complexifie donc encore le problème déjà complexe de la régénération de pouvoir réducteur.

5. Performances de croissance et d'accumulation lipidique de la souche *Rhodotorula glutinis* à partir de diverses sources carbonées.

5.1. Potentialités de croissance

5.1.1. A partir du glucose comme source carbonée

Le taux de croissance maximal de *R. glutinis* sur milieu salin avec le glucose comme source carbonée, lors d'une culture en réacteur, est de 0,27 h⁻¹ et le rendement est alors de 0,54 g/g (Thèse Granger, 1992).

5.1.2. A partir du xylose en simple ou co-substrat avec le glucose

Le xylose est le second sucre le plus abondant, après le glucose, dans la biomasse ligno-cellulosique. Alors qu'un grand intérêt est actuellement porté à l'utilisation de d'hydrolysats cellulosiques comme matières premières pour la production de biomasse ou de métabolites d'intérêt, les performances de croissance de micro-organismes à partir de xylose sont un point de départ dans cette perspective.

La croissance de *R. glutinis* sur xylose est très peu caractérisée. Pourtant, les quelques études relatant des potentialités de production de la souche à partir d'hydrolysats ligno-cellulosiques amènent à penser qu'elle est capable de consommer le xylose (Dai *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2010, Easterling *et al.*, 2009, Wiebe *et al.*, 2012). Cependant, l'objectif commun de l'ensemble de la littérature existante reste de caractériser les capacités d'accumulation lipidique. De ce fait, les dynamiques physiologiques dont la cinétique de consommation du pentose ne sont pas décrites et les expérimentations mises en œuvre se font à des concentrations cellulaires faibles et inférieures à 40g.L⁻¹ (Wiebe *et al.*, 2012). Le métabolisme de la souche *R. glutinis* à partir de ce sucre alternatif dans des conditions optimales de croissance reste donc à explorer.

Les voies métaboliques microbiennes sont principalement centrées autour de l'utilisation du glucose. Toutefois, la plupart des micro-organismes possèdent la machinerie nécessaire à l'utilisation de sucres alternatifs, tels que le xylose. Les mécanismes de contrôle et de régulation des voies métaboliques glucidiques varient d'une espèce à l'autre, mais d'une manière générale ils se font de deux manières. Tout d'abord, le transport d'un sucre alternatif est inhibé quand un sucre préférentiel est présent dans le milieu. D'autre part, il existe une répression catabolique du glucose à l'origine d'une régulation de la transcription des gènes codant des enzymes impliquées dans le catabolisme des sources carbonées alternatives dont le xylose. La part relative de ces deux phénomènes est difficile à évaluer. Dans le cas de la consommation du xylose, un troisième verrou potentiel à considérer en sus des deux cités précédemment est l'équilibre en co-facteurs, point clé de l'entrée du xylose dans la voie des pentoses phosphate. Tous ces éléments jouent donc en la défaveur de la co-consommation du glucose et du xylose. Chez *Rhodotorula glutinis* la co-consommation de glucose et de xylose dans une culture de 25 heures en mode batch à partir d'un milieu contenant les deux sucres en excès ainsi que du furfural et de l'acide acétique s'est avéré inexistante (Zhang *et al.*, 2011). Par ailleurs, au cours de ce même mode de culture mais en présence d'un seul des deux sucres,

il a été révélé la capacité de la souche à consommer du xylose en simple substrat avec toutefois une cinétique de croissance plus lente que celle observée sur glucose : $\mu_{\text{glucose}} = 0.31\text{h}^{-1}$ et $\mu_{\text{xylose}} = 0.22\text{h}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2011).

L'étude de la répression catabolique sur la co-consommation pentose-glucose chez une souche *Saccharomyces cerevisiae* recombinante capable de consommer le xylose a été étudiée lors de cultures en mode batch : le maltose ayant des perméases spécifiques et étant intracellulairement hydrolysé en D-glucose (Subtil and Boles, 2012) la quantification de la co-consommation du maltose et du xylose a révélé que, en présence de maltose la consommation du C5 décroît de 20 à 30% ; ce pourcentage refléterait l'impact de la répression catabolique des hexoses sur la consommation des pentoses. Cette diminution est par ailleurs probablement corrélée aux activités enzymatiques de la voie glycolytique déterminant le flux glycolytique maximal étant donné que les fermentations ne sont pas réalisées en mode discontinu alimentée avec un contrôle des flux de carbone.

L'étude de Pitkänen sur les flux de carbone intracellulaire chez une souche modifiée de *Saccharomyces cerevisiae* pour la consommation de xylose, cultivée en mode continu, révèle que la co-consommation glucose-xylose est maximale quand la concentration en glucose est minimale (co-consommation optimale observée pour une concentration en glucose inférieure à 0.1g/L) (Pitkänen *et al.*, 2003).

Enfin, il a été démontré chez *Rhodospiridium toruloides* que les activités xylitol déshydrogénase, xylose réductase et phosphokétolase, premières enzymes impliquées dans l'assimilation du xylose, sont présentes sur un milieu contenant du xylose, alors qu'elles sont inexistantes sur un milieu contenant du glucose (Freer *et al.*, 1997). Les mécanismes d'induction par le xylose de la synthèse des enzymes impliquées dans l'assimilation du pentose restent peu explorés et encore méconnus.

5.1.3. A partir du glycérol en simple ou co-substrat avec le glucose

La production annuelle mondiale de glycérol s'élève à plus de 2,5 millions de tonnes. Il est en particulier, le sous-produit majoritaire de la production de biodiesel, responsable de 60% de sa production comme cela est décrit dans la réaction suivante :



Le glycérol peut être utilisé comme source de carbone et d'énergie par la plupart des levures. Mais, de même que pour le xylose, la co-consommation simultanée de deux sources de carbone pose le problème de la répression catabolique. Toutefois la consommation de glycérol chez *Rhodotorula glutinis* a été très peu étudiée. En particulier, aucune caractérisation cinétique et aucun effet sur le rendement n'a été reporté. Les études menées quant aux potentialités d'accumulation lipidique à partir de glycérol révèlent toutefois indirectement la capacité de la souche à consommer ce substrat (Easterling *et al.*, 2009, Saenge *et al.*, 2010, Yen *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2014).

5.2. Bioprocédés et potentialités d'accumulation lipidique

5.2.1. Performances d'accumulation à partir du glucose comme source carbonée.

La capacité de *R. glutinis* à accumuler des lipides à partir de glucose est désormais bien connue et les performances de production lipidique de la souche sont parfaitement caractérisées (Tableau 14) (Granger, 1992, Cescut, 2010.)

Tableau 14 : Performances de production lipidique de *R. glutinis* à partir de glucose.

Mode de culture	[X] g.L ⁻¹	% lipides g _{lip} .g _x ⁻¹	Vitesse spécifique de production g _{lip} .g _x ⁻¹ .h ⁻¹	Rendement g _{lip} .g _{glucose} ⁻¹	Références
Fed-batch	100	40	0.072	0.31	Granger, 1992
Fed-batch	130	72	0.035	0.224	Cescut, 2010

Des cultures à hautes densités cellulaires, atteignant 130g.L⁻¹ ont été réalisées sur milieu minéral et glucose ; ces travaux ont permis d'investiguer les capacités maximales de production lipidique de la souche *R. glutinis*. Ainsi, en 65 heures, la concentration en biomasse totale cultivée est multipliée par 40, le pourcentage de lipides accumulés correspond à la valeur maximale de la souche (72% de la masse sèche), le rendement obtenu de 0.42C_{mol}.C_{mol}⁻¹ correspond à 95% du rendement théorique limite (Cescut, 2010). Dans ces conditions, le profil des acides gras totaux accumulés principalement sous forme de TAG est majoritairement constitué d'acide oléique (C18:1) et d'acide palmitique (C16:0) (Tableau 15).

Tableau 15 : Profil des acides gras totaux accumulés par *R. glutinis* en fin de phase d'accumulation lors d'une culture sur glucose en mode fed-batch, 30°C, pH 5.5 (Cescut, 2010)

Acide Gras	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18 :3
Teneur (% g _{AGi} .g _{AGtot})	30	1	10	48	9	2

5.2.2. A partir du xylose comme source carbonée.

Les potentialités de production de lipides par *R. glutinis* à partir de xylose ont fait l'objet de peu de travaux publiés. Des essais ont été réalisés majoritairement à partir de biomasse lignocellulosique (Chen *et al.*, 2009 , Li *et al.*, 2010, Dai *et al.*, 2007), en mode batch et le plus souvent en fioles d'Erlenmeyer ; la composition de la matière première reste imprécise notamment sa composition en inhibiteurs issus du prétraitement du substrat, ce qui limite l'interprétation des résultats. Ces expériences révèlent qualitativement toutefois la faisabilité de la production de lipides à partir de substrats lignocellulolitiques mais ne permettent en aucun cas une caractérisation des potentialités optimales de production à partir de xylose. Wiebe *et al.* (Wiebe *et al.*, 2012) ont réalisé une série d'expériences en cultures batch et fed-batch, à partir de xylose seul ou d'un mélange glucose, xylose, arabinose. Le Tableau 16 présente les principaux résultats extraits de leur publication.

Tableau 16 : Principaux résultats de production lipidique à partir de xylose (Wiebe et al., 2012.)

souche	Mode de culture	Source de carbone	Productivité g/L/h	Rendement (g/g)	Teneur en lipide (% en masse)	Biomasse g/L	commentaires
<i>Rhodospiridium toruloïdes</i>	batch	Xylose (30g/L)	0.03	0.08	24	11	C/N = 40
			0.04	0.11	36	10	C/N=65
			0.04	0.16	45	8	C/N=100
<i>Rhodospiridium toruloïdes</i>	batch	25g.L ⁻¹ glucose 33g.L ⁻¹ xylose 11g.L ⁻¹ arabinose	0.07-0.08	0.09-0.010	28-31	20	Les sucres sont consommés de manière séquentielle : initialement le glucose, puis le xylose et enfin l'arabinose.
<i>Rhodospiridium toruloïdes</i>	Fed-batch	6g.L ⁻¹ glucose 55g.L ⁻¹ xylose 8g.L ⁻¹ arabinose	0.15	0.07	58	27	Carence azote
	Fed-batch	6g.L ⁻¹ glucose 55g.L ⁻¹ xylose 8g.L ⁻¹ arabinose	0.08	0.08	38	39	C/N=65
	Fed-batch	6g.L ⁻¹ glucose 55g.L ⁻¹ xylose 8g.L ⁻¹ arabinose	0.07	0.08	31	38	C/N=80

D'une manière générale, outre le fait que la faisabilité de l'accumulation lipidique sur xylose soit clairement démontrée, il est observé, lors des expérimentations réalisées en batch, que les potentialités d'accumulation de lipides, en termes de pourcentage accumulés sont plus faibles sur xylose que celles mises en évidence sur glucose (Cescut *et al.*, 2014, Granger *et al.*, 1992). Ainsi, Wiebe *et al.* observent que, dans les mêmes conditions, la souche accumule 30% de lipides supplémentaires à partir de glucose qu'à partir de xylose. Par ailleurs, à partir de glucose et par comparaison aux résultats obtenus à partir de xylose, la productivité est deux fois supérieure, et les rendements supérieurs de 30% (Wiebe *et al.*, 2012). L'étude cinétique de l'accumulation de lipides lors des expérimentations réalisées en mode fed-batch, réalisée par Wiebe *et al.* met en évidence que les valeurs des vitesses spécifiques et le rendement massique de production sur xylose sont deux à trois fois inférieures à celles observées sur glucose dans des conditions identiques. Enfin, il semblerait que le profil lipidique obtenu sur xylose soit légèrement différent de celui obtenu sur glucose avec une légère surproduction de C16:0 et de 18:2 au détriment de la synthèse de C18:0 (Wiebe *et al.*, 2012).

5.2.3. A partir du glycérol comme source carbonée

Les expérimentations visant à caractériser la production lipidique de *R. glutinis* à partir de glycérol sont elles aussi peu nombreuses (Tableau 17) et ne font l'objet d'aucune caractérisation cinétique. Si ces expérimentations démontrent la possibilité de produire des lipides à partir de glycérol, elles ne permettent pas de caractériser le métabolisme de la souche et son comportement cinétique.

Tableau 17. Principaux résultats de production lipidique de *Rhodotorula glutinis* à partir de glycérol.

Mode de culture	Substrat	Concentration en biomasse g/L	Teneur en lipides (% du poids sec)	Rendement en lipides	Commentaires	Réf.
batch	glycérol		38		Temps =48h Cultures batch en erlen C/N=10	Easterling <i>et al.</i>, 2009
batch	Glycérol brut concentration 9.5%	8.17	52.91	0.067 g lipide/g glycérol	Batch fermenteur 2L Ajout de tween 20 (surfactant, 1% dans milieu) au milieu de culture C/N=85	Saenge <i>et al.</i>, 2010
Fed-batch	Glycérol brut	13.77	60.70	0.033g lipide/g glycérol	Fed Batch fermenteur 2L Ajout de tween 20 (surfactant, 1% dans milieu) au milieu de culture C/N=85	Saenge <i>et al.</i>, 2010
			34.2-42.5	0.20-0.22g lipide/g glycérol		Yang <i>et al.</i>, 2014

Ainsi, les meilleurs résultats obtenus en termes d'accumulation lipidique sont ceux réalisés par Saenge et al. en mode fed-batch où l'accumulation lipidique atteint jusqu'à 60% de la masse sèche. Cependant, l'utilisation de tween 20 lors de ces fermentations rend l'interprétation difficile (le tween 20 contenant lui-même des acides gras) (Saenge *et al.*, 2010).

Le profil lipidique de *R. glutinis* cultivé sur glycérol est reporté Tableau 18.

Tableau 18 : Profil lipidique de *Rhodotorula glutinis* cultivée sur glycérol pur (Saenge *et al.*, 2010).

AG	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Pourcentage (% AG/AG _{totaux})	27.8	0.6	21.8	43.8	2.9	1.2

Ce profil lipidique est proche de celui observé sur glucose, à l'exception du C18:1 qui semble sur-accumulé par rapport aux cultures sur glucose, principalement au détriment du C18:2. Des travaux réalisés sur une levure oléagineuse très étudiée, *Y. lipolytica* (Cescut, 2009), mettent en évidence d'une part, la capacité de la levure oléagineuse à co-consommer le glucose et le glycérol dans un ratio de 50% - à condition d'alimenter en substrats carbonés de telle sorte que le glucose soit limitant - d'autre part, le maintien des performances d'accumulation lipidique comparativement à celles observées sur glucose seul ainsi qu'une amélioration du rendement en lipide par rapport au substrat d'environ 20% (Tableau 19). La littérature actuelle n'évoque pas de tels résultats pour *Rhodotorula glutinis*.

Tableau 19 : Variables biologiques obtenues lors de la culture de *Y. lipolytica* (WT) à 28°C, à pH 5.5 avec le glucose comme unique substrat et en co-substrat glucose/glycérol. (Cescut, 2009).

Variables	Unité	Glucose seul	Co-substrat glucose/glycérol
[X]max	[CmolX.L-1]	4.17	3.35
%lip max	[Cmollip.CmolX-1]	0.52	0.53
μ^* max	[h-1]	0.258	0.255 (glucose seul)
q^* lip max	[Cmollip.CmolX-1.h-1]	0.044	0.049
RS/X*max	[CmolX.Cmolglu-1]	0.58	0.57 (glucose seul)
RS/lip max	[Cmollip.Cmolglu-1]	0.372	0.45

6. Conclusions

Dans un contexte environnemental, économique et politique favorable à l'émergence de nouvelles filières des biocarburants, les travaux de recherche pour proposer des alternatives aux

carburants d'origine fossile se sont intensifiés. Les perspectives d'augmentation des consommations en carburants routiers et aéronautiques ont permis d'identifier des besoins croissants en huiles pour des usages biodiesel et biojetfuel avec en particulier, pour ce dernier, la récente certification des huiles hydrotraitées en mélange jusqu'à 50% avec du kérosène classique d'origine fossile. La production d'huiles microbiennes mobilise donc de nombreuses équipes de recherche internationales depuis plus d'une trentaine d'années avec une intensification récente des efforts.

La production d'huiles par des levures dites oléagineuses, dont la mise en œuvre mobilise des technologies matures dans l'industrie depuis près de deux siècles, se présente comme une alternative prometteuse à court-moyenterme. De l'analyse comparative des résultats mentionnés dans la littérature, *Rhodotorula glutinis* (*Rhodospiridium toruloides*), qui peut accumuler jusqu'à 70% de sa masse sèche en lipides (majoritairement des TAG) à partir de glucose, est une levure candidate à fort potentiel. La croissance et le mécanisme de synthèse, de stockage et de dégradation des lipides de cette souche à partir de glucose sont aujourd'hui bien décrits et donc bien caractérisés. L'accumulation de lipides, induite par un stress, est optimale lors d'une limitation en azote, qui permet une croissance résiduelle nécessaire au renouvellement de la biomasse catalytique en présence d'un excès de flux carboné. Les paramètres de cultures optimaux de croissance et de production sont similaires à savoir un pH de 5.5, une température de 30°C et des conditions aérobies. Ces conditions nécessitent le contrôle des paramètres environnementaux dont les flux de carbone et d'azote, contrôle qu'il est notamment possible de mettre en œuvre en culture fed batch.

Dans un contexte de mobilisation de substrats lignocellulosiques et de diversification des ressources carbonées pour la production de carburants alternatifs, un challenge scientifique réside dans l'étude des possibilités de *R. glutinis* de convertir en lipides le xylose, le glycérol, purs ou en mélanges avec le glucose. C'est un domaine du métabolisme de cette levure très peu connu. Les travaux antérieurs exploratoires sont en nombres restreints et les auteurs ont mis en œuvre des cultures en mode batch sur des substrats complexes ; les résultats argumentent de la capacité de *R. glutinis* à croître et accumuler des lipides à partir de xylose ou de glycérol. Leurs interprétations restent cependant limitées du point de vue des connaissances du métabolisme de *R. glutinis* ; ces données qualitatives doivent être complétées par une quantification rationnelle en termes de cinétiques et de rendement pour comprendre la dynamique physiologique de la souche, que ce soit en condition de croissance ou de production de lipides ainsi que pour

identifier son potentiel maximal en conditions contrôlées. Les cofacteurs, leur interconversion et leur répartition intracellulaire sont des éléments clés de la co-consommation de substrats pour la croissance et l'accumulation lipidique chez *R. glutinis*.

Afin d'avancer dans l'exploration des potentialités de *R. glutinis* pour la conversion de substrats pentose et glycérol en lipides, de nombreuses questions scientifiques restent aujourd'hui en suspens : quelle est la capacité de *R. glutinis* de co-consommer le xylose ou le glycérol avec le glucose ? Quel est le comportement dynamique de *R. glutinis* en termes de cinétiques de croissance et de production de lipides, à partir des substrats d'intérêt purs ou en mélange ? Quels sont les éventuels coproduits et comment s'affranchir de leur production ? Quel est l'impact des substrats sur la nature et la composition des macromolécules accumulées ? Est-il possible de déduire de la connaissance du métabolisme des modes de gestion des flux de carbone et d'azote pour optimiser un procédé de production de lipidique à partir de ces substrats ?

Ce travail de recherche propose ainsi de contribuer à améliorer les connaissances pour répondre à ces questions ; la démarche expérimentale consiste en la quantification, dans des conditions de culture parfaitement contrôlées, des dynamiques de croissance et de production de lipides chez *R. glutinis*, à partir de glycérol et de xylose, en simple et co-substrat avec du glucose.

Partie 3 : Matériel et méthodes

1. Souche et milieux de culture

1.1. Souche étudiée

La souche de levure oléagineuse utilisée est une souche sauvage de *R. glutinis* CECT 1137 fournie par la Coleccion Espagnola de Cultivo Tipo, Université de Valence, Espagne. Cette souche a été choisie pour sa robustesse et pour ses fortes capacités d'accumulations lipidiques pouvant aller jusqu'à 70% (Ratledge, 1988). Ses conditions optimales de croissance sont, sur milieu salin, une température de 30°C, un pH de 5,5 et des conditions de cultures aérobies (Granger, 1992). De forme ovoïde, *R. glutinis* se caractérise par sa couleur rose qui apparaît dès lors que la souche se trouve dans des conditions non optimales de croissance.

1.2. Milieux de culture

1.2.1. Milieu de conservation

La souche utilisée pour chaque expérimentation provient d'un stock obtenu par congélation de fractions aliquotes d'une culture réalisée sur milieu riche (YPD), en phase de croissance exponentielle. A chaque volume d'aliquote est ajouté un volume identique de glycérol, servant à protéger les cellules. Ces échantillons placés dans une cryotube sont ensuite congelés à -80°C.

1.2.2. Milieu de réveil de la souche

Le milieu Yeast extract Peptone Dextose (YPD) est un milieu riche utilisé pour « réveiller » la souche. Il est utilisé sous sa forme solide (formulation avec agar) pour la réalisation d'isolements en boîtes de Pétri. Il est aussi utilisé sous forme liquide (formulation sans agar) pour la réalisation des premières phases de la préculture (Tableau 20).

Tableau 20 : Composition du milieu YPD.

Composé	Concentration [g.L ⁻¹]
Extrait de levure	10
Bactopeptone	20
Glucose	20
Agar	20

1.2.3. Milieu salin initial

La composition du milieu salin utilisé pour les dernières phases de précultures (cf. paragraphe 3.1.2. page 88) ainsi que pour la culture en fermenteur de *R. glutinis* est récapitulée dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Composition du milieu salin.

Composés	Concentration (g.L ⁻¹)
Di-hydrogéo potassium phosphate	4,500
Sulfate de magnésium	1,710
Chlorure de calcium	0,018
Sulfate de fer	0,070
Sulfate de manganèse	0,003
Chlorure de cobalt	0,025
Sulfate de zinc	0,016
Molybdate de sodium	0,001
Acide borique	0,010
Glucose	20,000
Ammonium mono hydrogéo phosphate	0,830
Ammonium sulfate	1,710
Cuivre sulfate	0,003
Chlorure de sodium	0,039

Acide orthophosphorique qsp pH5.5

Afin de minimiser au maximum les risques de précipitations, les oligo-éléments sont ajoutés au milieu salin après autoclavage (121°C, 20min) à partir de solutions cent fois concentrées stérilisées par filtration de seuil 0,2 µm. Par ailleurs, le pH du milieu, abaissé à 4,5 avant autoclavage est réajusté à 5,5 à l'aide d'une solution commerciale d'ammoniaque une fois le milieu stérilisé. Le glucose (20g.L⁻¹) et les vitamines sont ajoutés au milieu après stérilisation à partir de solutions concentrées (cf. paragraphe 078).

1.2.4. Sels d'alimentations

Au cours de la culture, des sels d'alimentation sont ajoutés de manière asservie à l'ajout de source carbonée à raison de 10% en volume. La composition des solutions de sels concentrés

respectivement utilisées pour les expérimentations en condition de croissance et en condition d'accumulation lipidique sont récapitulées dans le Tableau 22 et le Tableau 23.

Tableau 22 : Composition des sels d'alimentation utilisés pour les expérimentations en conditions de croissance.

Composés	Concentration (g.L ⁻¹)
Acide orthophosphorique	90,733
Magnésium Sulfate, 7H ₂ O	36
Calcium Chlorure, 2H ₂ O	0,092
Fer Sulfate, 7 H ₂ O	3
Manganèse Sulfate, H ₂ O	0,103
Cobalt Chlorure, 6H ₂ O	1,49
Zinc Sulfate, 7H ₂ O	1,143
Molybdate Sodium, 2H ₂ O	0,301
Acide sulfurique	212 ,565
Cuivre Sulfate, 5H ₂ O	0,5
Sodium Chlorure	10
Acide orthoborique	0,035
Chlorure de potassium	55,83

Tableau 23 : Composition des sels d'alimentation utilisés pour les expérimentations en conditions d'accumulation lipidique.

Composés	Concentration (g.L ⁻¹)
Acide orthophosphorique	28,62
Magnésium Sulfate, 7H ₂ O	5,278
Calcium Chlorure, 2H ₂ O	0,051
Fer Sulfate, 7 H ₂ O	0,215
Manganèse Sulfate, H ₂ O	0,009
Cobalt Chlorure, 6H ₂ O	0,158
Zinc Sulfate, 7H ₂ O	0,078
Molybdate Sodium, 2H ₂ O	0,036
Acide sulfurique	16,37
Cuivre Sulfate, 5H ₂ O	0,009
Acide orthoborique	0,0025

1.2.5. Solution concentrée de substrats, vitamines et régulation de pH

Le(s) substrat(s) carboné(s) glucose, xylose ou glycérol sont ajoutés au milieu de manière continue à l'aide de pompes. Les solutions sont concentrées (Tableau 24) afin de minimiser au maximum le volume apporté au fermenteur.

Tableau 24 : Concentration des substrats d'alimentation.

Composés	Concentration (g.L ⁻¹)
Glucose	700
Xylose	550
Glycérol	600

La concentration exacte de chacune des solutions de glucose et de glycérol est déterminée après stérilisation par mesure de leur masse volumique à l'aide d'un densimètre (densimètre DE40, Mettler Toledo) et d'une table concentration-masse volumique (D.W. and R. H. Perry, Perry's chemical engineer's Handbook. McGraw-Hill Professionnal). Etant donné qu'il n'existe pas de table référencée concentration-masse volumique pour les solutions de xylose, la concentration de la solution de xylose est déterminée par HPLC après dilution par 100.

Afin de satisfaire les besoins nutritionnels de la levure, les vitamines sont ajoutées au milieu de culture (Tableau 25). Un volume de solution correspondant à 1‰ du volume de culture est ajouté tous les 10 g_x.L⁻¹ supplémentaires de biomasse catalytique.

Tableau 25 : Composition de la solution concentrée de vitamines.

Composés	Concentration (g/L)
d-biotine	0,05
Panthoténate	1
Acide nicotinique	1
Thiamine hydrochloride	1
Acide p-amino-benzoïque	0,2
Pyridoxol hydrochloride	1
Myoinositol	25

La régulation de pH est assurée par un apport d'une solution commerciale d'ammoniaque (28%) pour les expérimentations en conditions optimales de croissance. Pour les expérimentations en conditions d'accumulation lipidique, deux solutions sont utilisées pour réguler le pH : une solution d'ammoniaque à 10 mol.L^{-1} utilisée lors de la phase initiale de croissance et une solution de potasse à 10 mol.L^{-1} lors de la phase d'accumulation lipidique.

2. Le fermenteur et le logiciel de commande et d'acquisition

2.1. Le réacteur instrumenté

2.1.1. Le fermenteur

La culture en mode discontinu alimenté est mise en œuvre dans un réacteur (Braun, biostat E, b. Braun diessel, biotech. Melsungen, Allemagne) de 20 litres de volume utile, stérilisable sur site (Figure 22).

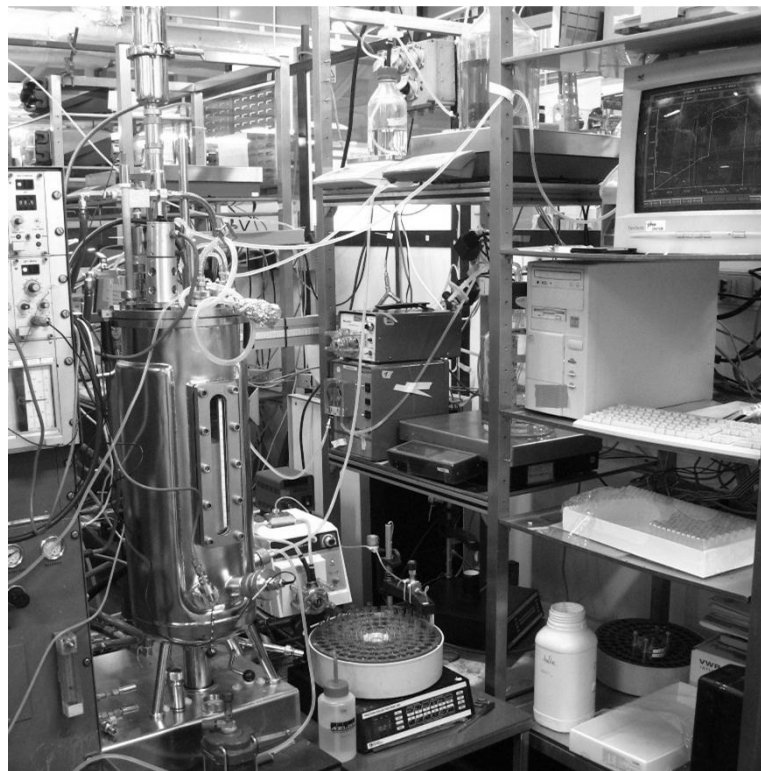


Figure 22: Photographie du montage expérimental.

L'agitation est faite par l'action de trois turbines Rushton équi-réparties sur leur axe. L'homogénéité du milieu est supposée parfaite. La présence de six piquages permet l'instrumentation du réacteur.

2.1.2. L'instrumentation

Le fermenteur est équipé d'une sonde température, d'une sonde à oxygène dissous (Ingold, Urdorf, Suisse), d'une sonde pH (Fermprobe Broadley-James Co., Santa Ana, USA), d'une sonde biomasse (Fogale Nanotech) d'un capteur de pression et d'une sonde de niveau de mousse. La sonde à oxygène dissous permet de mesurer la concentration en oxygène dissous du moût de fermentation et indique ainsi la nécessité de l'ajustement manuel des conditions d'agitation et d'aération de manière à maintenir la teneur en oxygène dissous au-dessus de 20% de la valeur saturante. La sonde biomasse mesure la capacitance du moût de fermentation via deux électrodes de platine, dont le signal peut être corrélé à la concentration en biomasse viable.

Pour permettre un échantillonnage régulier du surnageant à intervalle très rapproché (15 min), un collecteur de fraction est installé sur une boucle de dérivation comprenant un module de filtration tangentielle (0,2 μ) à l'intérieur duquel le moût circule grâce à une pompe péristaltique (Masterflex 77521-57) dont la commande de se fait via le logiciel détaillé dans le paragraphe 2.

2.1.3. Les actionneurs

Les fermentations sont réalisées à température constante. Ainsi, la régulation de la température est assurée par l'intermédiaire d'une double enveloppe. L'eau y circulant est tempérée selon deux systèmes : un échangeur à plaques (refroidissement) et un bain chauffé par résistance électrique. Ce dispositif rend possible la régulation de température même aux fortes exo-thermicités propres aux cultures à hautes densités cellulaires. La régulation du pH se fait via deux pompes péristaltiques situées sur le module de régulation apportant respectivement une solution basique (ammoniaque ou potasse) située sur une balance (Sartorius, IP65, 1200g) et une solution d'acide ortho-phosphorique. Une troisième pompe péristaltique permet l'adjonction séquentielle (2 secondes) d'un anti-mousse (Struktol® J673) suivant une détection continue de 4 secondes par la sonde antimousses dont la position est ajustée manuellement en fonction de l'évolution du volume du moût de fermentation.

2.1.4. Les alimentations

Les bidons contenant les solutions de substrats carbonés, d'alimentation en sels concentrés et d'ammoniaque (pour les expérimentations en condition d'accumulation lipidique) sont placés sur des balances (Sartorius 2200g, 5200g, 16000g et 16100g Goettingen, Allemagne), dont l'acquisition des masses se fait par l'intermédiaire du logiciel (cf. paragraphe 2.2. page 81). La détermination en ligne des masses autorise l'estimation et le suivi des débits massiques de substrats et d'ammoniaque introduits dans le réacteur. Quatre pompes péristaltiques (B. Braun FE4111, 3 Gilson Minipuls 3) sont dédiées à l'ajout des substrats carbonés, azoté et des sels concentrés dans le réacteur. Elles sont commandées par l'intermédiaire du logiciel détaillé dans le paragraphe 2.

2.1.5. Les gaz

Le débit massique de gaz entrant est mesuré par un débitmètre (modèle 5850 TR, BROOKS Instrument, Emerson Process Management, USA). La composition des gaz de sortie préalablement séchés est mesurée par un analyseur à spectrométrie infrarouge pour le dioxyde de carbone et un analyseur paramagnétique pour l'oxygène (EGAS 8, B. BRAUN, Allemagne).

2.2. Acquisitions en ligne et logiciel de commande

2.2.1. Description

Tous les systèmes de mesure en ligne et les actionneurs sont connectés à un ordinateur de type PC par une interface Analogique / Digital – Digital / Analogique et des ports série type RS 232. Les différents paramètres pouvant être suivis en ligne sont listés dans le Tableau 26.

Tableau 26: Mesures en ligne avec leur mode de supervision et la précision des mesures.

Paramètres régulés ou contrôlés	Mode de Supervision	Précision des mesures
Température	Mesuré et régulé	0,1 °C
pH	Mesuré et régulé	0,05 upH
Oxygène dissous	Mesuré	0,1 % sat
Pression relative	Mesuré et régulé	1 mb
Agitation	Mesuré et régulé	1 rpm
temps de marche des pompes d'antimousse, acide et base	Mesuré et régulé	1 s
Masse pesée par les balances	Mesuré	de 0,1 à 0,01 g
Composition des gaz de sortie	Mesuré	0,01 %
Débit massique d'aération	Mesuré	0,1 NL.h ⁻¹
Débit des pompes d'alimentation	Commandé	0,001 L.h ⁻¹
Dioxyde de carbone dissous	Mesuré	0,2%

Ainsi, le module d'entrée-sortie permet l'acquisition en ligne des données des capteurs, du temps de fonctionnement des pompes de liquides régulateurs de pH et d'antimousse ainsi que la commande des pompes d'alimentation en substrat, tandis que la liaison asynchrone reliant les balances au calculateur permet la lecture en ligne de la masse des réservoirs.

Le programme de gestion de l'alimentation du réacteur en substrat a été développé au sein de l'équipe Fermentation Advances and Microbial Engineering du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (Granger, 1992). Différents modes de commande des débits des pompes (croissant ou décroissant) sont disponibles : constant, linéaire, exponentiel et sigmoïde (Figure 23). Ils permettent des conduites adaptées à la culture. Dans le cadre de ce travail, seuls les débits exponentiels ont été utilisés.

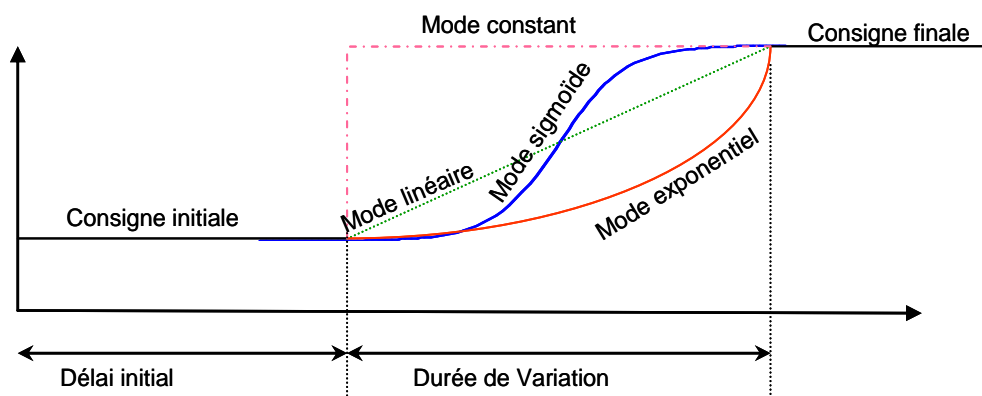


Figure 23: Modes de consigne des pompes péristaltiques disponibles grâce au programme de gestion de l'alimentation du réacteur.

Ce logiciel effectue à chaque nouvelle acquisition de l'analyseur de gaz l'acquisition et le filtrage des mesures ainsi que le stockage des données. Il permet l'estimation de variables calculées à partir des données disponibles en ligne (Tableau 27). Celles-ci permettent d'estimer les bilans sur le carbone, l'azote et le degré de réduction généralisé.

Tableau 27 : Liste des variables estimées en ligne et leur unité.

Variable estimées	[unité]	Variable estimées	[unité]
Masse Substrat Ajout S1	[g]	Vitesse O2	[mol.L ⁻¹ .h ⁻¹]
Concent. Equiv. S1	[g.L ⁻¹]	Vitesse CO2	[mol.L ⁻¹ .h ⁻¹]
Carbone ajout, S1	[mol.L ⁻¹]	Crésiduel / Cajout	[Cmol.Cmol ⁻¹]
Carbone ajout, S1	[mol]	Carbone résiduel	[mol.L ⁻¹]
Volume réacteur	[L]	Azote total	[mol]
μ f(Substrat)	[h ⁻¹]	Azote / Carbone	[mol.mol ⁻¹]
μ f(pO2)	[h ⁻¹]	Carbone ajout, S2	[mol.L ⁻¹]
μ f(NH3)	[h ⁻¹]	Carbone ajout, S2	[mol]
μ f(CO2)	[h ⁻¹]	Carbone ajout, total	[mol]
Volume Base	[mL]	Carbone ajout, total	[mol.L ⁻¹]
Volume Acide	[mL]	Carbone Accu. total	[mol]
Vitesse O2	[mol.h ⁻¹]	Carbone Accumulé total	[mol.L ⁻¹]
Vitesse CO2	[mol.h ⁻¹]	Caccum/Cajout	[Cmol.Cmol ⁻¹]
Coefficient Respiratoire	[/]	Redox accumulé	[/]
K _{La}	[h ⁻¹]		
Intégrale O2	[mol]		
Intégrale CO2	[mol]		

Le taux de croissance est estimé de trois manières différentes, à partir de la consommation des liquides correcteurs de pH, de l'oxygène ou de la quantité de dioxyde de carbone produit. Le volume réactionnel est estimé à partir du volume initial, des volumes prélevés et des volumes ajoutés. La précision des variables estimées en ligne est liée à la précision des outils de mesure et des étalonnages effectués.

2.2.2. Calculs des consignes d'alimentation.

2.2.2.1. Calculs des consignes d'alimentations en conditions de croissance

2.2.2.1.1. Débit exponentiel d'une source carbonée

Dans le cas où la source carbonée est limitante pour la croissance et que la concentration résiduelle en substrat est constante, le taux de croissance est constant, selon le formalisme de Monod. La vitesse spécifique de croissance s'écrit alors :

$$qs = \frac{\mu}{Y_{s/x}} + m \text{ (Équation 8),}$$

avec $Y_{s/x}$ le rendement théorique limite et m le coefficient de maintenance.

Le bilan de matière sur le réacteur s'écrit selon l'équation suivante :

$$\frac{d(S.V)}{dt} = V \cdot \frac{dS}{dt} + S \cdot \frac{dV}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{s/x}} + m\right) \cdot X \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot S_A \text{ (Équation 9)}$$

avec S la concentration en substrat ($C_{mol.L^{-1}}$), V le volume du fermenteur (L) et S_A ($C_{mol.L^{-1}}$) la concentration équivalente en substrat dans l'alimentation tenant compte des autres volumes apportés de manière proportionnelle (alimentation en sel et en substrat B).

La variation du volume de culture prenant en compte les volumes de substrats ajoutés s'écrit :

$$\frac{d(V)}{dt} = Q(t) \text{ (Équation 10).}$$

L'équation 9 devient alors :

$$\frac{d(S.)}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{s/x}} + m\right) \cdot X + \frac{Q(t)}{V} \cdot (S_A - S) \text{ (Équation 11).}$$

Or, la variation de concentration en substrats est supposée nulle. Par ailleurs, l'équation bilan pour la biomasse s'écrit :

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV \text{ (Équation 12).}$$

Si le taux de croissance est constant, la solution est alors :

$$XV(t) = X_0 V_0 e^{\mu t} \text{ (Équation 13).}$$

$$\text{Ainsi, } \frac{d(S.)}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{S/X}} + m\right).X. + \frac{Q(t)}{V}.(S_A - S) = 0 \text{ soit}$$

$$Q(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{S/X}} + m\right) \frac{X_0 V_0 e^{\mu t}}{S_A} \text{ (Équation 14).}$$

Si μ est constant, le rendement en biomasse s'exprime par la relation $R_{S/X} = \mu / (\mu / Y_{S/X} + m)$ et peut être considéré comme constant, et S négligé devant S_A , l'équation du débit peut être approchée par :

$$Q(t) = \frac{\mu}{R_{S/X}} \cdot \frac{X_0 V_0 e^{\mu t}}{S_A} \text{ (Équation 15).}$$

Au temps $t=0$, l'équation 15 s'écrit :

$$Q_0 = \frac{\mu}{R_{S/X}} \cdot \frac{X_0 V_0}{S_A}$$

dans laquelle $M_0 = \frac{X_0 V_0}{R_{S/X}}$ représente la quantité totale de substrat consommé depuis le début de la culture, ou de la préculture en supposant le rendement constant. Cette valeur est donc connue ou mesurable. Ainsi, l'équation de débit permettant d'obtenir une croissance exponentielle pendant une durée t devient :

$$Q_{(t)} = Q_0 e^{\mu t} \text{ (Équation 16).}$$

2.2.2.1.2. Débit exponentiel de deux sources carbonées

Lors d'une culture en co-substrat, le débit total d'alimentation en carbone peut être déterminé selon les équations 8 et 9, et, à partir des masses molaires en C_{mol} des substrats et du ratio $Substrat_1 / Substrat_{total}$ souhaité, les débits relatifs à chaque substrat sont calculés. Le flux total de carbone s'écrit :

$$\Phi_{(t)}^{Carbone} = \Phi_{(0)}^{Carbone} . e^{\mu . t} \quad (\text{Équation 17})$$

$$\Phi_{(0)}^{Carbone} = \mu . C^{ajout} \quad (\text{Équation 18}).$$

On note Γ_C le ratio en carbone relatif à l'apport en substrat 1 (S_1) et en substrat 2 (S_2).

$$\Gamma_C = \frac{C^{S1}}{C^{S2}} \quad (\text{Équation 19})$$

$$\text{Soit } \Phi_{(0)}^{CarboneS1} = \frac{\Gamma_C}{1 + \Gamma_C} \mu . C^{ajout} \quad (\text{Équation 20})$$

$$\text{et } \Phi_{(0)}^{CarboneS2} = \frac{1}{1 + \Gamma_C} \mu . C^{ajout} \quad (\text{Équation 21})$$

$$\text{Soit } Q_{(t)}^{S1} = \frac{\Gamma_C}{1 + \Gamma_C} . \frac{1}{C_{Alim S1}^{carbone}} . \mu . C^{ajout} . e^{\mu . t} \quad (\text{Équation 22})$$

$$\text{et } Q_{(t)}^{S2} = \frac{1}{1 + \Gamma_C} . \frac{1}{C_{Alim S2}^{carbone}} . \mu . C^{ajout} . e^{\mu . t} \quad (\text{Équation 23})$$

L'apport total en carbone est réajusté manuellement afin de maintenir une concentration en glucose limitante nécessaire à l'assimilation du co-substrat. Les débits d'alimentation de deux substrats sont alors déduits des équations décrites ci-avant. La co-consommation des substrats peut être vérifiée en ligne par le suivi du rapport :

$$\frac{\Phi_{(t)}^{Carbone} - \Phi_{(t)}^{CO2}}{\Phi_{(t)}^{Carbone}} \quad \text{Équation 24}$$

qui doit demeurer inférieur au rendement théorique limite de référence sur glucose Y_{SX}^{th} .

2.2.2.1.3. Débit exponentiel de la solution saline.

Le débit de la solution saline est fixé à un dixième du débit d'alimentation total en substrat pour les phases de croissance pure. Ce facteur correspond à un rendement théorique (Y_{SX}^{th}) en biomasse de $0,6 \text{ C}_{mol} . \text{C}_{mol}^{-1}$. Il est révisé en cours de culture en fonction du rendement carbone réellement mesuré en ligne par :

$$\frac{1}{10} \cdot \frac{Y_{SX}^{mesuré}}{Y_{SX}^{th}} \quad \text{Équation 25}$$

2.2.2.2. Calculs des consignes d'alimentations spécifiques aux conditions d'accumulation lipidique

2.2.2.2.1. Calculs du débit de la solution d'ammoniaque

Le taux de croissance en phase d'accumulation lipidique (μ^{prod}) est contrôlé par le flux d'apport en azote (ammoniaque). Le débit de l'alimentation est déterminé par l'équation :

$$Q_{(t)}^{NH_3} = Q_0^{NH_3} \cdot \exp(\mu^{prod} \cdot t) \quad \text{Équation 26}$$

$$\text{avec } Q_0^{NH_3} = \mu^{prod} \cdot \frac{NH_3^{cons}}{M_{NH_3}^{feed}} \quad \text{Équation 27}$$

où NH_3^{cons} est la quantité d'azote consommée lors de la rentrée en carence et $M_{NH_3}^{feed}$ la molarité en ammoniac dans la solution d'alimentation.

2.2.2.2.2. Calculs du débit de la solution saline

L'asservissement du débit de la solution saline est fixé selon l'équation 28.

$$Q_{(t)}^{sels} = \frac{1}{10} \cdot Q_{(t)}^{NH_3} \cdot \frac{M_{Cmole}^{Subs} \cdot M_{NH_3}^{feed}}{Y_{SX}^{th} \cdot \mathcal{E}_X^N \cdot S_{A\lim}} \quad \text{Équation 28}$$

avec \mathcal{E}_X^N égal au ratio N/C dans la biomasse catalytique.

3. Mise en œuvre des expérimentations

3.1. Mise en œuvre des fermentations

3.1.1. Préparation de l'expérimentation

Plusieurs étapes de préparation ont lieu avant le début de l'expérimentation. Il s'agit tout d'abord d'instrumenter le réacteur, de vérifier le bon fonctionnement des sondes et de procéder à leur étalonnage. En parallèle, les débits mètres massique, l'analyseur de gaz et le capteur de pression sont vérifiés et étalonnés. Le réacteur est ensuite stérilisé sur place. Il est ensuite nécessaire de réaliser l'étalonnage des pompes d'ajout de substrat, et d'apport de milieu salin, et de déterminer le débit de régulation du pH (pompes acide et base) Les différentes solutions et le petit matériel (solution saline, de la solution concentrée en glucose, du réservoir de liquide correcteur de pH, de l'antimousse, des tuyaux nécessaires aux différentes alimentations, des piquages inox, les fioles d'Erlenmeyer bafflées) sont stérilisés à l'autoclave (121°C, 20min). La masse volumique des solutions de substrat stériles est déterminée afin d'en déduire les concentrations réelles en solutés.

3.1.2. Phases de précultures

Les phases de précultures satisfont le déroulement suivant (Tableau 28).

Tableau 28: Phases de précultures

Étalement sur boîte de pétri (milieu gélosé YPD) d'une suspension stock de glycérol. Incubation 48h à 30°C.	Tube stérile (5mL milieu YPD) Inoculation à partir d'une colonie isolée sur boîte Incubation 12h à 30°C sur table agitante.	Fiole d'ermenmeyer bafflée stérile 1L (50mL de milieu YPD) Inoculation à partir d'un tube (5mL). Incubation 12h à 30°C sur table agitante (100 RPM).	Fiole d'ermenmeyer bafflée stérile 5L (100mL de milieu synthétique, source de carbone glucose). Inoculation à partir de l'erien précédent Incubation 12h à 30°C sur table agitante (100 RPM).
--	---	--	---

3.1.3. Cultures : mise en œuvre et stratégie de conduite.

A l'issue des phases de précultures, le réacteur est inoculé à 10% en volume. La concentration en biomasse initiale est la plus faible possible (autour de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$) afin de minimiser les interférences des acquis métaboliques potentiels durant les phases de précultures. Qu'il s'agisse des expérimentations réalisées en conditions de croissance ou d'accumulation lipidique, à partir d'un seul ou de deux substrats, les apports en carbones sont faits de telle sorte qu'ils soient limitants. Ainsi, lors des expérimentations en condition de croissance, la croissance de la biomasse est gérée par la maîtrise du taux de croissance via une limitation par le carbone. Par ailleurs, lors de l'apport de deux sources carbonées, pour permettre la co-consommation, une seconde limitation intrinsèque à l'apport total en carbone est mise en place de telle sorte que le flux de glucose soit limitant pour permettre la consommation du deuxième substrat.

La conduite de culture en condition d'accumulation lipidique repose sur la maîtrise du flux d'azote, facteur d'induction de l'accumulation utilisé dans les expérimentations mises en œuvre. Dans ce cas, le taux de croissance de la souche est fixé par le flux d'azote, apporté de manière limitante. C'est alors la maîtrise coordonnée des flux d'azote et de carbone qui permet d'une part le maintien d'une croissance cellulaire et, d'autre part la direction du flux de carbone excédentaire vers l'accumulation lipidique.

4. Méthodes analytiques

4.1. Suivi de la biomasse totale et caractérisation de la croissance

4.1.1. Détermination de la biomasse catalytique

La biomasse catalytique est la biomasse métaboliquement active ou cultivable. Elle se définit comme la biomasse totale privée des produits intracellulaires accumulés dont les quantités respectives sont déterminées d'après les mesures et dosages décrits ci-dessous.

4.1.2. Mesure de la densité optique

L'évolution de la densité cellulaire est suivie par spectrophotométrie. La mesure est effectuée à 620 nm (spectrophotomètre Hitachi® U-1100) dans une cuve en verre de 2 mm de

trajet optique. La suspension cellulaire est préalablement homogénéisée à l'aide d'un vortex et, si nécessaire, diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,05 et 0,5 unités d'absorbance.

4.1.3. Réalisation de masses sèches

La concentration en biomasse sèche, exprimée en g.L^{-1} , est mesurée par une méthode gravimétrique. Un volume connu de culture est filtré à l'aide d'une pompe à vide sur une membrane Sartolon polyamide 0,45 μm (Sartorius®) préalablement séchée et pesée. Après filtration et rinçage à l'eau distillée, la membrane est séchée à l'étuve à 60°C sous vide (200 mm de Hg) pendant 48 h, puis pesée. Ainsi, la différence de masse avant et après filtration de la suspension cellulaire rapportée au volume traité permet de déterminer la masse sèche cellulaire en g.L^{-1} .

4.1.4. Microscopie

L'observation microscopique, faite sur un appareillage Olympus Bh2, Japon équipé d'objectifs DplanApo10UVPL et DApo100UVPL, permet de contrôler la mono-axénie de la culture, de déceler d'éventuelles modifications morphologiques, de constater la formation des corps lipidiques. L'acquisition des images est effectuée par une caméra CCD DXM 1200, Nikon, Japon. Elles sont numérisées sous un format 975*715 pixel avec la carte graphique Matrox 975-0201. La résolution du système d'acquisition permet d'observer des détails de la taille de 0.2 μm .

4.2. Analyse des substrats et métabolites extracellulaires par HPLC

Le dosage des concentrations en substrats résiduels (glucose, xylose, glycérol) et des éventuels métabolites extracellulaires (xylitol) est effectué par chromatographie liquide haute performance. Il s'agit d'une HPLC Waters alliance 2690 (Tableau 29) équipée d'une pré-colonne Biorad de type Carbo-P et d'une colonne 87 H Sigma (Tableau 30). Les conditions d'analyses sont récapitulées dans le Tableau 31. Avant analyse, chaque échantillon est filtré sur un filtre en polyamide de seuil 0.2 μm . La détermination de la concentration des métabolites est faite à partir d'une courbe de calibration.

Tableau 29 : Caractéristiques de l'HPLC Waters

Paramètres	Conditions
Echantillonneur, pompe et four	Chromatographe (WATERS®, Alliance 2690)
Détecteur I	réfractomètre (WATERS® 2414)
Détecteur II	détecteur UV à barrette diode (WATERS® 996)
Volume d'échantillon injecté	20 µL
Logiciel d'acquisition et de traitement des données	Millenium 3.2 (WATERS)

Tableau 30 : Caractéristiques de la colonne 87 H Sigma

Dimensions	300mm*7,8mm
Forme ionique de la résine	Hydrogène
Support	Copolymère sulfoné de styrène divinyle benzène
Taille des particules	9µm
Pression maximale	1 500 Psi
Débit maximal à la température maximale	1,0mL/min
Température maximale	65°C
Phase mobile	H ₂ SO ₄ 5mM
Intervalle de pH	5-9

Tableau 31 : Conditions d'analyses

Paramètres	Conditions d'analyses
Température du four	50 °C
Débit de la phase mobile	0,5 mL.min ⁻¹
Durée	30 min

4.3. Analyse des métabolites intracellulaires

4.3.1. Extraction et analyse des lipides

Le dosage des lipides accumulés est effectué selon la méthode développée au sein de l'équipe FAME par Julien Cescut (Cescut, 2009). L'analyse des lipides intracellulaires nécessite les étapes de préparation de l'échantillon, extraction, purification et analyse. Il est à noter que du fait de l'utilisation de solvant organique, tous les contenants utilisés sont résistants aux solvants et leur manipulation se fait sous une hotte chimique. Par ailleurs toute la verrerie utilisée pour l'extraction de lipides est préalablement rincée à l'acide nitrique à 10%, pour la laver d'éventuels lipides contaminants.

4.3.1.1. Préparation des échantillons

Avant toute analyse, les culots d'échantillons expérimentaux, stockés au congélateur après centrifugation lors de l'échantillonnage, sont rincés trois fois à selon le cycle suivant : re-suspension du culot dans 5 volumes d'eau déminéralisée glacée, centrifugation du moût de culture à 5000 g à 4°C pendant 10 min, élimination du surnageant. Les échantillons lavés sont ensuite congelés à -80°C puis lyophilisés (lyophilisateur Christ LCG, Alpha 2-4 LD plus) pendant 5 jours. Les lyophilisats peuvent être conservés plusieurs jours avant analyses dans un dessiccateur aux parois opaques contenant du Silicagel (Prolabo ; 27615.291), sous atmosphère azote.

4.3.1.2. Extraction des lipides

L'extraction des lipides est faite par Accelerated Solvent Extraction (Accelerated ASE 200, DIONEX, Californie, USA). Le principe de l'extraction repose sur l'injection de solvants dans l'échantillon sous pression (le gaz vecteur est l'azote pour éviter l'oxydation des lipides) et haute température (Tableau 32 et Tableau 33). Ainsi, 500 mg de lyophilisat sont introduits dans une cellule d'extraction de 11 mL auxquels sont ajoutés 2 g d'hydromatrix (VARIAN, Californie, USA). L'hydromatrix évite que le lyophilisat de levure ne se compacte en fixant les éventuelles traces d'eau.

Tableau 32 : Cycles mis en œuvre lors de l'extraction par ASE.

Mélange	Méthanol	Chloroforme	Hexane
A	1/3	2/3	0
B	1/2	1/2	0
C	2/3	1/3	0
D	0	0	1

Tableau 33 : Paramètres de l'ASE pour l'extraction des lipides

Paramètres	Valeur
Nombre de cycles	4
Répétition de chaque cycle	4
Pression	100 bar
Température	100 bar
Durée totale de l'extraction	60 min
% renouvellement du solvant	100%
% de purge	100%
Temps de purge	60 s
Phase de chauffage	15 min
Phase statique	15 min

A l'issue des 4 cycles d'extraction appliqués à chaque échantillon, les lipides dilués dans les solvants organiques sont récupérés dans des vials.

4.3.1.3. Purification

Les extraits lipidiques peuvent potentiellement être contaminés par des protéines et des débris cellulaires. Après évaporation des solvants d'extraction à l'aide d'un évaporateur rotatif multiposte (Genevac 2Z+), la purification des extraits lipidiques est effectuée par ajout à l'échantillon d'un volume d'une solution de KCl à 0.88% (m/V) et d'un volume identique de chloroforme. Ainsi, deux phases se forment : la phase aqueuse contenant les débris cellulaires et la phase organique contenant les lipides. Après séparation des phases par centrifugation (5 min, Génévac 2Z+), la phase aqueuse est éliminée.

4.3.1.4. Evaporation

La phase organique est évaporée grâce à un évaporateur rotatif multiposte (programme : mixed solvents, Genevac 2Z+), sous vide et à température ambiante.

4.3.1.5. Analyse des lipides extraits

4.3.1.5.1. Détermination de la masse

La teneur en lipide est calculée par différence de masse entre le vial d'ASE vide et le vial d'ASE avec l'extrait lipidique pur. Cette masse est rapportée à la masse de lyophilisat utilisé pour l'extraction.

4.3.1.5.2. Caractérisation des acides gras totaux par GC-FID.

L'analyse de la composition en acides gras totaux se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur FID (Tableau 34 et Tableau 35).

Tableau 34: Conditions opératoires de la caractérisation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Paramètres	Conditions
Echantillonneur, pompe et four	HP 6890 Series GC system
Détecteur	FID
Logiciel d'acquisition et de traitement des données	Chromeleon (DIONEX)
Colonne	CP-Select CB for FAME fused silica WCOT
Température de l'injecteur	50m*0.25mm*0.25µm (VARIAN)
Température du four	50°C
Température du détecteur	Programmation (cf.
Durée de l'analyse	Tableau 35)
Phase mobile	310°C
Débit de la phase mobile	37min
Volume d'échantillon injecté	azote
Split	40 mL.min ⁻¹
	1µL
	20

Tableau 35 : Gradient de température du four mis en œuvre lors de l'analyse par GC-FID des acides gras totaux.

n° de rampe	Vitesse °C.min ⁻¹	Température (°C)	Pallier à température fixe (min)
0	-	50	-
1	15	140	-
2	6	190	-
3	8	240	-
4	29.99	290	-
5	40	275	5

L'analyse des échantillons par GC-FID nécessite une étape préalable de dérivation afin de rendre les lipides volatils pour une analyse en phase gazeuse. Elle se fait par méthylation de la fonction carboxylique des acides gras libres ou estérifiés via l'action du trimethylsulphonium hydroxide (TMSH) à 0.2N dans du méthanol. L'efficacité de la réaction est supérieure à 99.5%. La quantification des acides gras libre se fait par la méthode de l'étalon interne avec l'acide décanoïque (C10:0). Ainsi, les vials de GC sont préparés par mélange de 50 µL d'étalon interne, 50 µL de TMSH et 50µL de l'extrait à quantifier resuspendu dans du méthanol de telle sorte que la concentration en lipides totaux soit comprise entre 0.5 à 2 g_{AG}.L⁻¹. Après 10s d'agitation et 20 min de repos à température ambiante, le mélange peut-être injecté.

Une gamme étalon allant de 0,5 à 2 g_{AG}.L⁻¹ est réalisée pour les acides gras majoritaires identifiés chez *R. glutinis* à savoir l'acide palmitique (C16:0), l'acide palmitoléique (C16:1), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linolénique (C18:3).

4.3.2. Dosages des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux intracellulaires est effectué selon la méthode phénol-acide sulfurique (Dubois et *al.*, 1956) sur les culots d'échantillons préalablement lavés trois fois à l'eau déminéralisée glacée et dilués pour se situer dans une gamme de DO comprise entre 0,05 et 0,5 unités d'absorbance. Dans un tube à essai, sont introduits 0,5mL d'échantillon, 1mL de solution de phénol à 5% (V/V) et 5mL d'acide sulfurique concentré à 95-97%. Le tube est agité

au vortex puis mis à incuber dans un bain marie à 50°C pendant 1h (la durée d'incubation a été doublée par rapport au protocole développé par Dubois, afin de pallier à la résistance à l'hydrolyse des cellules de *R. glutinis*). Après refroidissement des tubes dans de la glace pendant 20min, la DO du mélange est mesurée à 486 nm. La lecture de l'absorbance se fait avec un lecteur micro-plaque (Biotek Syergy HT). Les résultats sont exprimés en grammes équivalents de glucose par litre à partir d'une gamme étalon de glucose et mannose en proportions égales allant de 0 à 0.1g.L.⁻¹

4.4. Analyses CHONPS

L'analyse de la composition élémentaire de la biomasse en éléments Carbone, Hydrogène, Oxygène, Azote, Phosphore et Soufre a été confiée au Service Central d'Analyses du CNRS à partir d'échantillons lyophilisés.

4.5. Calcul de la consommation d'azote

La consommation d'azote est calculée sur un intervalle de temps à partir du débit de la pompe du feed de la solution d'azote, à savoir selon la formule :

$$Q_{(t)}^{NH_3} \times M_{feed}^{NH_3} \times \Delta t$$

5. Traitement des résultats

5.1. Analyse des Gaz de culture

L'activité métabolique de la biomasse peut être corrélée à l'évolution de la composition des gaz de sortie du réacteur. Afin de quantifier les vitesses de consommation d'oxygène et de production de dioxyde de carbone, un bilan des gaz est réalisé sur le système réacteur illustré par la figure 24.

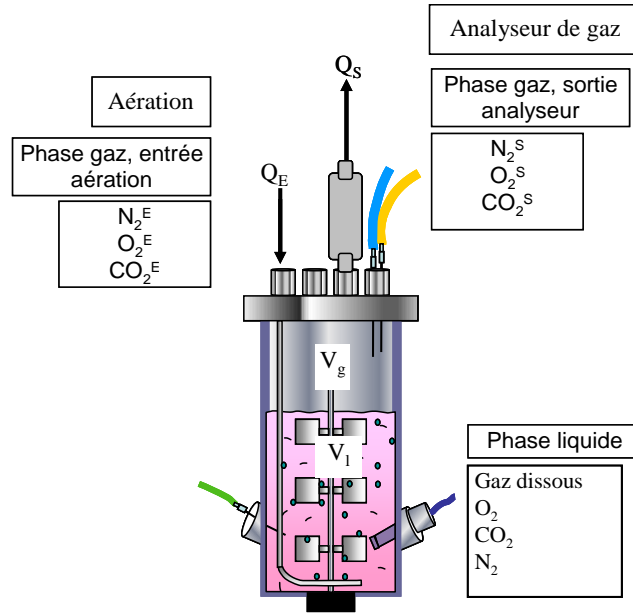


Figure 24: Schéma du système réacteur illustrant l'entrée et la sortie des gaz associées aux variables utilisées pour le calcul des bilans gazeux.

5.1.1. Bilan pour un composé A du gaz

L'équation de conservation de la matière pour la phase gazeuse et la phase liquide peut s'écrire : Accumulation = [entrée - sortie]_{flux} + [production - consommation]_{réaction} soit mathématiquement : $\frac{d(A_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(A_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_E \cdot A_E - Q_S \cdot A_S) + r_A^{net} \cdot V_L$ (Équation 29)

avec V_L et V_g : les volumes liquide et de gaz dans le réacteur, exprimés en litres (déterminé par le calcul des moles de volume mesurées/volume molaire relatif à la pression et à la température de travail), Q_E et Q_S les débits gazeux à l'entrée et à la sortie du réacteur en mol.h^{-1} (déterminés à partir du débit mesuré en nL.h^{-1} divisé par le volume molaire correspondant à la pression et à la température de travail), A_E et A_S les fractions molaires de l'espèce A dans les gaz d'entrée et de sortie du réacteur et r_A^{net} la vitesse nette de réaction. On regroupe sous le terme de flux de transfert global (Φ_A), le terme d'accumulation dans la phase liquide ainsi que le terme de production ou de consommation nette.

$$\frac{d(A_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_E \cdot A^e - Q_s \cdot A^s) + \Phi_A \quad (\text{Équation 30})$$

$$\Phi_A = \frac{d(A_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + r_A^{net} \cdot V_L$$

avec

$$r_A \text{ la vitesse nette de conversion décrite par } r_A = \frac{\Phi_A + \frac{d(V_L \cdot A_{dissous})}{dt}}{V_L}.$$

5.1.2. Azote

L'azote moléculaire n'étant pas métabolisé par le microorganisme, il ne subit qu'un phénomène de transport au sein de la phase liquide sans conversion. Etant très peu soluble dans la phase liquide (solubilité à 15°C à pression atmosphérique $22 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), le terme $\frac{d(N_{2gdissous} \cdot V_L)}{dt}$ peut être négligé. Le flux global de transfert d'azote peut donc lui aussi être négligé. Avec ces hypothèses, il est possible d'estimer le débit de sortie Q_S d'après la mesure du débit d'entrée Q_E et les compositions en azote N_2^E et N_2^S des gaz d'entrée et sortie.

$$Q_S = \frac{\frac{d(V_g \times N_2^E)}{dt} + Q_E \times N_2^E}{N_2^S} \quad (\text{Équation 31})$$

5.1.3. Oxygène

Les flux du transfert du dioxyde de carbone et de l'oxygène peuvent être exprimés par :

$$\Phi_{CO_2} = \frac{d(V_g \times CO_2^S)}{dt} - Q_E \times CO_2^E + Q_S \times CO_2^S \quad (\text{Équation 32})$$

$$\Phi_{O_2} = \frac{d(V_g \times O_2^S)}{dt} - Q_E \times O_2^E + Q_S \times O_2^S \quad (\text{Équation 33})$$

D'après l'équation de conservation de la matière pour la phase gazeuse et la phase liquide (Equation 29), on peut écrire :

Soit mathématiquement :

$$\frac{d(A_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(A_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_E \cdot A_E - Q_S \cdot A_S) + r_A^{net} \cdot V_L \quad (\text{Équation 34}).$$

Du fait de l'absence de phénomène biologique dans la phase gazeuse, on obtient:

$$r_{O_2} = \left| -r_{O_2}^{net} \right| = (Q_E O_2^E - Q_S O_2^S - \frac{d(O_2^S \cdot V_g)}{dt} V_g - \frac{d(O_2^{dis} \cdot V_l)}{dt} V_l) / V_l \quad (\text{Équation 35})$$

En égalant les flux de transfert gaz-liquide, nous obtenons :

$$V_g \cdot \Phi_{O_2}^{g-l} = -V_l \cdot \Phi_{O_2}^l \quad (\text{Équation 36}),$$

avec $\Phi_{O_2}^{g-l}$: densité volumique de flux de transfert de la phase gazeuse vers la phase liquide, et,

$$Q_E O_2^E - Q_S O_2^S - \frac{dO_2^S}{dt} V_g = \frac{dO_2^{dis}}{dt} V_l - r_{O_2} \cdot V_l = V_l \cdot k_L a \left(O_2^{sat} - O_2^{dis} \right) \quad (\text{Équation 37})$$

On en déduit la vitesse de consommation volumique en oxygène,

$$r_{O_2} = (Q_E O_2^E - Q_S O_2^S - \frac{dO_2^S}{dt} V_g - \frac{dO_2^{dis}}{dt} V_l) / V_l \quad (\text{Équation 38})$$

Pour ce qui est du transfert il faut connaître la fraction molaire en oxygène dans les gaz quittant le moût de fermentation O_2^F

$$Q_s \cdot (O_2^F - O_2^S) = \frac{dO_2^S V_g}{dt} \quad (\text{Équation 39}),$$

$$\text{soit } O_2^F = \frac{1}{Q_s} \frac{dO_2^S V_g}{dt} + O_2^S \quad (\text{Équation 40})$$

$$\text{On a ensuite } gradO_2 = \frac{(pO_2^F - pO_2^E) \cdot H_{O_2}}{\ln\left(\frac{pO_2^F \cdot H_{O_2} - O_2^{dis}}{pO_2^E \cdot H_{O_2} - O_2^{dis}}\right)} \quad (\text{Fyferling, 2007}) \quad \text{Équation 41},$$

avec H_{O_2} la constante de Henry déterminée d'après $H_{O_2} = \frac{10^{-6} \cdot C^O}{0,2094}$ avec C^O la solubilité de

l'oxygène ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) calculée selon l'équation établie par Benson *et al.* :

$$\ln C^O = -135.29996 + 1.572288 \times \frac{105}{T} - 6.637149 \times \frac{107}{T^2} + 1.243678 \times \frac{1010}{T^3} - 8.621061 \times \frac{1011}{T^4} - (0.02573 - \frac{12.142}{T} + 2.3631 \times \frac{103}{T^2}) \times S \quad (\text{Équation 42})$$

avec T la température (en °K) et S la salinité (en g_{sel} .L⁻¹) à pression atmosphérique P = 101325 Pa et oxygène atmosphérique soit une pression partielle en oxygène égale à $P_{O_2}^{air} = 101325 \cdot O_2^{air}$ (Pa) (Benson et Krause, 1984).

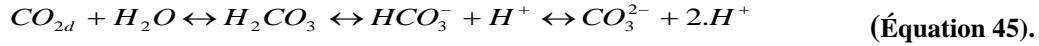
$$\text{et } k_L a = \frac{1}{gradO_2} \cdot \frac{(Q_E O_2^E - Q_s O_2^F)}{V_l} \quad (\text{Équation 43})$$

5.1.4. Dioxyde de carbone

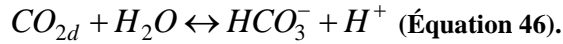
L'expression de la vitesse de production de CO₂ est :

$$r_{CO_2} = \frac{\Phi_{CO_2} - \frac{d(CO_{2s}^{dissou} \cdot V_l)}{dt}}{V_l} \quad (\text{Équation 44})$$

Toutefois, le dioxyde de carbone présent dans la phase liquide peut se dissocier sous différentes formes :



Comme l'acide carbonique se dissocie de façon pratiquement instantanée, H_2CO_3 et CO_3^{2-} sont minoritaires. Ainsi, l'équation régissant les équilibres du dioxyde du carbone dans les moûts de fermentation étudiés peut être réduite à :



La constante d'équilibre de cette dissociation est dépendante de la température et de la salinité du milieu de culture :

$$\log_{10}K_1 = -3633.86/T + 61.2172 - 9.6777 \times \ln T + 0.011555 \times S - 0.0001152 \times S^2 \quad (\text{Équation 47})$$

Au vu de la forte solubilité du dioxyde de carbone, il est généralement admis que, pour les cultures microbiennes, la concentration en CO_2 dissous est en quasi-équilibre thermodynamique avec la phase gazeuse. Selon la loi de Henry, la concentration en CO_2 dissous peut être estimée proportionnelle à la pression partielle en CO_2 au-dessus du liquide dans le gaz effluent :

$$CO_2^{dis} = pCO_2^F . H_{CO_2} \quad (\text{Équation 48}),$$

avec H_{CO_2} la constante de Henry pour le CO_2 qui suit la loi suivante :

$$\ln H_{CO_2} = 9345.17/T - 0.2409 + 23.3585 * \ln(T/100) + (0.023517 - 2.3656 \times 10^{-4}T + 4.7036 \times 10^{-7}T^2) \times S. \quad (\text{Équation 49})$$

La quantité totale de CO_2 dans le milieu (ou carbone inorganique total CIT) est donc donnée par l'équation suivante :

$$CIT = CO_{2d} + HCO_3^- = CO_{2d} + \frac{\kappa.CO_{2d}}{H^+} = P_{CO_2^F} . H_{CO_2} . (1 + \frac{K_1}{10^{-pH}}) \quad (\text{Équation 50}).$$

Toutefois, il a été mesuré dans l'équipe FAME que l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique n'était pas vérifiée et que la pression partielle en dioxygène dissous pouvait être de 1,5 à 2 fois plus élevée que la pression partielle mesurée dans les gaz effluents. Cette constatation est également reportée dans la littérature sans explication mécanistique satisfaisante à ce jour (Hiltbrunner et Zizek, 2006).

Compte tenu de cette réalité expérimentale, le CIT dans la phase liquide sera estimé moyennant un facteur correctif ($F_{CO_2}^{Corr}$), soit :

$$CIT = F_{CO_2}^{Corr} \cdot P_{CO_2^F} \cdot H_{CO_2} \cdot \left(1 + \frac{K_1}{10^{-pH}}\right) \quad \text{Équation 51}$$

$$\text{avec } CO_2^F = \frac{1}{Q_S} \frac{dCO_2^S V_g}{dt} + CO_2^S$$

D'après l' $r_{CO_2} = \frac{\Phi_{CO_2} - \frac{d(CO_{2s}^{dissou} \cdot V_l)}{dt}}{V_l}$ (Équation 44, la vitesse de production de dioxyde de carbone sera évaluée par

$$r_{CO_2} = \frac{(Q_S \cdot CO_2^S - Q_E \cdot CO_2^E) + \frac{d(CIT \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(CO_2^g \cdot V_g)}{dt}}{V_l} \quad \text{Équation 52}$$

5.2. Variable volume

Afin de pouvoir exploiter les mesures des dosages, exprimées en quantité de matière par unité de volume, on s'affranchit des variations du volume réactionnel dues aux différents apports et prélèvements, en travaillant sur les grandeurs massiques ou molaires. Pour une variable ouverte, la relation permettant de relier les grandeurs exprimées en densité volumique par rapport aux grandeurs massiques est la suivante :

$$\frac{d(e \cdot V)}{dt} = e \cdot \frac{dV}{dt} + V \cdot \frac{de}{dt} = r_E \cdot V + \varphi_E \cdot V = r_E \cdot V + \Phi_E \quad \text{(Équation 53).}$$

L'estimation de l'évolution du volume de culture V_{cult} dépend des différents volumes apportés ou soutirés sur le système :

- Volume initial V_0
- Volume de sels ajouté V_{sels}
- Volume de liquide correcteur de pH V_{pH}
- Volume d'eau évaporée V_{evap}
- Volume prélevé $V_{prél.}$
- Volume solution d'alimentation substrat V_{alim}

Afin de prendre en compte les variations de volume correspondant à l'apport de la source carbonée et sa conversion en phase solide (biomasse), la solution d'alimentation est dissociée en eau et fraction organique convertie qui définit un volume équivalent (V_{equi})

$$V_{equi} = V_{H_2O}' + V_{X,P} \quad \text{(Équation 54)}$$

$$V_{H_2O}' = V_{alim} \cdot (\rho_{alim} - S_{alim}) \quad \text{(Équation 55)}$$

$$V_{X,P} = \alpha (V_{alim} - V_{H_2O}') \cdot (1 - Y_{S,CO_2}) \quad \text{(Équation 56)}$$

ρ_{alim} : masse volumique (kg/l)

S_{alim} : Concentration alim (kg/l)

Y_{S,CO_2} : rendement (g/g)

α : coefficient t correcteur

L'évolution temporelle du volume est calculée selon l'équation :

$$V_{(t)cult} = V_0 + \sum \Delta V_{(t)sels} + \sum \Delta V_{(t)equi} + \sum \Delta V_{(t)pH} - \sum \Delta V_{(t)ech} - \sum \Delta V_{(t)evap} \quad \text{(Équation 57)}$$

L'équation 57 est l'estimation du volume de culture. Le coefficient α est ajusté en égalant le volume expérimental mesuré en fin de culture à celui calculé.

Selon l'équation 29, les vitesses réactionnelles peuvent être calculées avec :

$$r_E \cdot V = \frac{1}{V_{(t)}} \frac{d(e_{(t)} \cdot V_{(t)}) - \int_0^t \Phi_E}{dt} \quad \text{Équation 58.}$$

Une autre approche consiste à s'affranchir des prélèvements (faisant varier la quantité de matière sans modifier la densité volumique) et de recalculer un volume théorique de culture prenant en compte uniquement les facteurs de dilution

$$\frac{de}{dt} = r_E + \varphi_E - e \cdot \frac{dV}{dt} \cdot \frac{1}{V} \quad \text{Équation 59}$$

$$\text{Lors d'un prélèvement } \varphi_E = \frac{\Phi_E}{V} = e \cdot \frac{dV}{dt} \cdot \frac{1}{V}. \quad \text{Équation 60}$$

Sur un intervalle de temps dt (pris suffisamment petit) la variation de volume hors prélèvement est :

$$d(V) = d(V_{sels}) + d(V_{équi}) + d(V_{pH}) - d(V_{évap}) \quad (\text{Équation 61})$$

Le facteur de dilution à un instant t s'exprime :

$$F_d(t) = 1 + \frac{d(V)}{V_{(t-1)}} \quad (\text{Équation 62})$$

Le volume théorique à un instant t s'écrit :

$$V_{théo}(t) = V_{Théo}(t-1) \times F_d(t), \text{ avec } V_{théo}(t=0) = V_0 \quad (\text{Équation 63})$$

Pour une variable fermée on calcule la quantité de grandeur E (e') permettant d'accéder à la vitesse nette molaire ou massique de réaction :

$$e' = e \cdot V^{thé} \Rightarrow r'_E = \frac{de'}{dt} \quad (\text{Équation 64})$$

Pour les gaz, la vitesse théorique est définie comme :

$$r'_{gaz} (\text{mole.h}^{-1}) = r_{gaz}^{mesure} \frac{V^{théorique}}{V^{mesuré}} (\text{mole.h}^{-1}) \quad (\text{Équation 65})$$

Pour les variables ouvertes, on calcule le substrat théorique consommé :

$$s' = \int_{t=0}^t \Phi_S \cdot \frac{V_{(t)}^{thé}}{V_{(t)}^{mesuré}} - s^{mesuré} \cdot V_{(t)}^{thé} \quad \text{qui conduit à} \quad r'_S = \frac{ds'}{dt} \quad (\text{Équation 66})$$

Les différentes données brutes sont traitées avec le logiciel de lissage et réconciliation LIREC développé au laboratoire. Les courbes sont, dans un premier temps, lissées selon un algorithme de spline sur une fenêtre glissante par ajustement des polynômes sur le critère des moindres carrés. Ce logiciel permet d'obtenir une continuité de la valeur lissée, de sa dérivée première et éventuellement de sa dérivée seconde. Le logiciel de réconciliation des vitesses réactionnelles calculées à partir des données lissées permet de détecter des défauts dans les bilans élémentaires (C, H, O et N) et redox et d'estimer l'évolution la plus probable des variables en satisfaisant ces bilans. Le logiciel permet, par ailleurs, d'attribuer une certaine confiance aux données expérimentales afin qu'il modifie préférentiellement les variables sur lesquelles un doute existe. Les données réconciliées résultent de l'intégration des vitesses réactionnelles satisfaisant à la contrainte de conservation des éléments. A partir de ces données réconciliées, d'autres calculs peuvent être réalisés tels que les vitesses spécifiques et les rendements.

5.3. Vitesses spécifiques, rendement et coefficient respiratoire

Les calculs sont exprimés en moles de carbone (C_{mol}). La C_{mol} se définit comme le nombre de moles d'une molécule calculé par rapport à une unité de carbone. Ainsi, le glucose dont la formule chimique globale est $C_6H_{12}O_6$ a en C_{mol} la formule suivante : CH_2O . 180 g de glucose représentent donc 1 mol et 6 C_{mol} . L'utilisation de la C_{mol} est primordiale lors de cultures en co-substrat car elle permet de comparer les apports des différents substrats.

q_{Ci} est vitesse spécifique de réaction de la variable C_i (unité de $C_{mol}.g^{-1}.h^{-1}$), elle s'exprime :

$$q_{Ci} = \left| \frac{r_{Ci}^{net}}{X_{cat}} \right| \quad (\text{Équation 67}),$$

avec r_{Ci} : vitesse nette de réaction pour la variable C_i et X_{cat} la concentration en biomasse.

La vitesse spécifique réelle qui correspond à la vitesse de réaction ramenée à une unité de biomasse catalytique notée : $q_e = \frac{r_e}{X_{cat}}$ (Équation 68).

La vitesse spécifique de croissance μ s'exprime en h^{-1} :

$$\mu = \frac{r_{Xcat}}{X_{cat}} \quad (\text{Équation 69}).$$

Le rendement de conversion du substrat en l'élément C_i s'écrit (en $C_{mol} \cdot C_{mol}^{-1}$) :

$$R_{C_i S} = \frac{\Delta C_i}{\Delta S} \text{ (Équation 70).}$$

Le coefficient respiratoire s'exprime: $QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}}$ (Équation 71).

5.4. Bilans élémentaires

5.4.1. Bilan carbone

Pour le bilan carbone, seuls interviennent les composés carbonés quantifiés en C_{mol} .
La conservation du carbone correspond à : carbone consommé = carbone produit.

$$\text{Soit } r_{\text{substrat 1}} + r_{\text{substrat 2}} = r_X + r_{\text{lipides}} + r_{\text{coproduit}} + r_{CO_2} \quad \text{(Équation 72)}$$

Ainsi, le bilan carbone en pourcentage s'exprime carbone consommé/ carbone produit:

$$100 * (r_{\text{substrat 1}} + r_{\text{substrat 2}}) / (r_X + r_{\text{lipides}} + r_{\text{coproduit}} + r_{CO_2}) \quad \text{(Équation 73)}$$

5.4.2. Bilan redox

Pour le bilan redox, le bilan effectué est le suivant : consommation = production.

En définissant S_i les substrats carbonés (glucose, glycérol, xylose), X la biomasse catalytique, $P_j^{int ra}$ les produits intracellulaires (lipides, polysaccharides) et P_k^{exo} les coproduits exocellulaires (xylitol), les bilans redox effectués sont les suivants :

$$\sum r_{S_i} \cdot \gamma_i + r_{O_2} \cdot \gamma_{O_2} = r_X \cdot \gamma_X + \sum r_{P_j^{int ra}} \cdot \gamma_{P_j^{int ra}} + \sum r_{P_k^{exo}} \cdot \gamma_{P_k^{exo}} \quad \text{Équation 74}$$

$$\text{Soit } \frac{\sum r_{S_i} \cdot \gamma_i + r_{O_2} \cdot \gamma_{O_2}}{r_X \cdot \gamma_X + \sum r_{P_j^{int ra}} \cdot \gamma_{P_j^{int ra}} + \sum r_{P_k^{exo}} \cdot \gamma_{P_k^{exo}}} \quad \text{Équation 75}$$

6. Le descripteur métabolique

6.1. Description générale

Le descripteur métabolique est un outil utilisé pour évaluer les principaux flux de carbone requis pour la production d'énergie (catabolisme), les voies de biosynthèse des constituants cellulaires (anabolisme) et les voies de biosynthèse des substances de réserves (production). Conjointement à cette distribution de la matière, il permet d'évaluer la production d'énergie et sa répartition dans les métabolismes. Il permet de faire le bilan sur l'implication des différentes réactions assurant la génération du pouvoir réducteur et la ré-oxydation des coenzymes réduits. Basé sur la quantité référence d'un gramme de biomasse catalytique les résultats peuvent être interprétés soit en termes stœchiométriques, soit en termes de vitesses spécifiques (biotiques et abiotiques). Il est construit de manière à être résolu sous contraintes, qui peuvent porter sur les rendements énergétiques et carbonés, les valeurs limites de flux intracellulaires, les ratios de flux selon un algorithme d'optimisation pouvant inclure la maximisation ou la minimisation d'un critère. La description métabolique est scindée en deux groupements réactionnels : l'ensemble des voies anaboliques et l'ensemble des réactions cataboliques et de production.

6.2. L'anabolisme

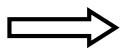
La biomasse est structurée en n classes de macromolécules auxquelles est associé un vecteur de fraction massique \vec{Frac} tel que $\sum_1^n Frac_i = 1$, auxquelles s'ajoutent les cendres. Les macromolécules intégrées au descripteur sont listées dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Macromolécules intégrées au descripteur métabolique

Protéines
ARN
ADN
Phospholipides
Polysaccharides
Triglycérides
Stérols
H ₂ O
CO ₂
Précurseurs libres

Chaque classe de macromolécules est décrite selon sa composition molaire en monomères (\vec{F}_i^{mono}) incluant l'énergie de polymérisation requise pour sa synthèse selon l'exemple présenté dans le Tableau 37.

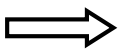
Tableau 37 : Exemple de réaction de polymérisation détaillant la synthèse d'une macromolécule.

0.1009*alanine + 0.0446*arginine + 0.0455*asparagine + 0.0455*aspartate + 0.0677*cysteine + 0.0386*glutamate + 0.0386*glutamine + 0.0992*glycine + 0.0449*histidine + 0.0333*isoleucine + 0.0579*leucine + 0.0457*lysine + 0.0175*methionine + 0.0256*phenylalanine + 0.1373*proline + 0.0325*serine + 0.0444*threonine + 0.0106*tryptophane + 0.0192*tyrosine + 4.324*ATP		1 PROTEINE
--	---	------------

Connaissant les masses molaires des monomères, la masse molaire de chacune des classes est établie (MM_i^{classe}). De même, une formule brute moyenne pour chacune des classes est définie. Ainsi, il est possible de déduire la composition élémentaire de la biomasse.

La réaction de synthèse de chaque monomère est décrite à partir des précurseurs métaboliques retenus, comme illustré avec l'exemple de l'arginine (Tableau 38).

Tableau 38 : Exemple de réaction de synthèse d'un monomère.

4*Ammoniac + 5*ATP + 3*NADH,H + 1*NADPH,H + 1*Acetyl CoA + 1*a-cetoglutarate + 1*Oxaloacetate + 1*CO ₂		1*Fumarate + 1*Acetate + 1*CoenzymeA + 1*arginine
---	---	---

Par soucis de simplification, l'eau n'apparaît pas, les coenzymes n'apparaissent que sous leur forme réduite, l'énergie sous forme d'équivalent ATP (1 ATP pour une réaction $ATP \rightarrow ADP$ et 2ATP pour une réaction $ATP \rightarrow AMP$). Chacune des réactions est vérifiée par un bilan carbone et un bilan redox.

A partir de la matrice stœchiométrique anabolique ($|S_{ana}|$) des réactions permettant la synthèse de l'ensemble des monomères (\vec{M}_{ono}) et à partir des précurseurs métaboliques (\vec{P}_{ana}) issus du métabolisme central, il devient possible de calculer la demande en précurseur (dont la liste est présentée dans le Tableau 39) en fonction de la composition macromoléculaire de la biomasse selon la séquence suivante :

- Construction du vecteur molaire

$$\vec{M}_{ono} = \{Frac_1 MM_1^{classe} \cdot \vec{F}_1^{mono}, Frac_i MM_i^{classe} \cdot \vec{F}_i^{mono}, Frac_n MM_n^{classe} \cdot \vec{F}_n^{mono}\}$$

- Calcul de la demande en précurseur

Le calcul de la demande en précurseur est fait selon l'équation :

$$\vec{P}_{ana} = |S_{ana}|^{-1} \cdot \vec{M}_{ono} \quad \text{Équation 76.}$$

L'ensemble des précurseurs intégrés au modèle métabolique est présenté sur le Tableau 39.

Tableau 39 : Liste des précurseurs

Tétrahydrofurane (THF)	Méthylène-THF	Méthyl-THF	Méthényl-THF	formyl-THF	Soufre
NH ₃	ATP	NADH ₂	NADPH ₂	Acétyl-CoA	Erythritol-phosphate
Fructose-phosphate	Glucose-phosphate	Alpha céto-glutarate	Oxaloacétate	Pentose-phosphate	Phosphoénolpyruvate
Phosphoglutarate	Pyruvate	Triose-phosphate	CO ₂	Fumarate	Acetate
Succinyl-CoA	Succinate	Glycérol-phosphate	Coenzyme A	O ₂	

La demande en précurseur est dépendante de la composition macromoléculaire de la biomasse catalytique qui peut être approchée par la détermination de sa composition

élémentaire mesurée $CH\epsilon_H O\epsilon_O N\epsilon_N P\epsilon_P S\epsilon_S$. De plus, d'après les mesures effectuées sur la biomasse et d'après la littérature, il est possible d'attribuer une répartition massique mesurée \vec{Frac}^{mes} . Afin de réconcilier ces ensembles de données expérimentales on recalcule la composition la plus probable de la biomasse $\hat{\vec{Frac}}$ en minimisant la fonction suivante

$$\mathcal{F} = \sum_1^n \frac{(\hat{Frac}_i - Frac_i^{mes})^2}{\hat{Frac}_i} + \sum_1^k \frac{(\hat{\epsilon}_j - \epsilon_j)^2}{\hat{\epsilon}_j} \text{ sous contrainte de } \sum_1^n \hat{Frac}_i = 1.$$

La demande en précurseurs anaboliques est déterminée à partir de cette biomasse théorique. Le tableau 40 illustre la composition de la biomasse intégrée au descripteur avant et après la réconciliation des données.

Tableau 40 : Composition de la biomasse utilisée dans le descripteur.

Composition biomasse	DATA / MESURES	ESTIME
PROTEINE	41.0%	35.65%
RNA	13.0%	13.44%
DNA	5.0%	2.76%
PHOSPHO LIPIDES	8.0%	8.12%
POLYSACCHARIDES	12.0%	23.02%
TRIGLYCERIDES	8.0%	6.89%
STEROLS	4.00%	2.84%
H ₂ O	4.00%	5.08%
CO ₂	1.00%	0.66%
Précurseurs libres	4.00%	1.53%
Cendres	8.00%	4.41%
total	108.00%	104.41%
total organique	100.00%	100.0%
C	1.000	1.000
H	1.758	1.751
O	0.537	0.515
N	0.150	0.157
S	0.001	0.001
P	0.02	0.018

6.3. Le catabolisme et la production

L'ensemble des réactions cataboliques et des réactions de biosynthèse des produits (\vec{r}) sont écrits sous la forme d'une matrice stœchiométrique ($|S_{cata}|$) incluant l'ensemble des métabolites (\vec{Met}) dont les métabolites intermédiaires et ceux échangés avec le milieu extracellulaire (les substrats). Un sens de réaction choisi par l'utilisateur (\vec{s}) est affecté à chacune des réactions décrites, ce qui permet la description des réactions réversibles prévenant ainsi des cycles futiles. Ainsi les flux réactionnels résultent du produit terme à terme du vecteur \vec{r} et du vecteur \vec{s} noté $\vec{r}_i \cdot \vec{s}_i$. Le produit entre la matrice stœchiométrique $|S_{cata}|$ et le vecteur de flux réactionnel $\vec{r}_i \cdot \vec{s}_i$ donne une vitesse nette de conversion de l'ensemble des métabolites ($\hat{\vec{r}}^{net} = |S_{cata}| \cdot \vec{r}_i \cdot \vec{s}_i$). En faisant l'hypothèse que les métabolites intermédiaires non précurseurs de

l'anabolisme ne sont pas accumulés, leur vitesse nette de conversion doit être nulle. La vitesse nette pour les précurseurs anaboliques doit, quant à elle, être égale à la demande précédemment calculée. La vitesse nette pour des métabolites échangés doit être égale aux flux de consommation ou de production. La liste des intermédiaires métaboliques est présentée dans le Tableau 41.

Tableau 41 : Liste des intermédiaires.

Tétrahydrofurane (THF)	Méthylène-THF	Méthyl-THF	Menyl-THF	F-THF	Soufre
NH ₃	ATP	NADH ₂	NADPH ₂	Acétyl-CoA	Erythritol-phosphate
Fructose-phosphate	Glucose-phosphate	Alpha cétooglutarate	Oxaloacétate	Pentose-phosphate	Phosphoénolpyruvate
Phosphoglutarate	Pyruvate	Triose-phosphate	CO ₂	Fumarate	Acetate
Succinyl-CoA	Succinate	Glycérol-phosphate	Coenzyme A	O ₂	Gluconate-phosphate
Malate	Heptulose-phosphate	Ribose-phosphate	Xylulose-phosphate	Isocitrate-mitochondrial	Glyoxyl
H ⁺	FADH ₂	Fructose diphosphate	Glyate diP	2-déhydro-3deoxy-phosphogluconate	Acétaldéhyde
Oléate	Acétyl-CoA - mitochondrial	Oxaloacétate - mitochondrial	Citrate - mitochondrial	Malonyl-ACP	Butyryl-CoA
Palmityl-CoA	Palmitoyl-CoA	Stearyl-CoA	Oleoyl-CoA	Linoleoyl-CoA	LnnCoA
Triacylglycérol (TAG)	Polysaccharides	Xylitol	Xylulose	NADH2-mitochondrial	Pyruvate-mitochondrial
Succinate-mitochondrial	Malate-mitochondrial	Fumarate-mitochondrial	Alpha cétooglutarate -mitochondrial	Citrate	Glucose
Glycérol	Xylose				

Avec $\bar{\varphi}_{ech}$ égal aux f flux de métabolites échangés, le descripteur sous sa forme mathématique

$$\text{doit satisfaire à la condition suivante } |S_{cata}| \cdot \vec{r}_i \cdot \vec{s}_i = \hat{r}^{net} = \begin{vmatrix} \hat{r}_{ech}^{net} \\ \hat{r}_{ana}^{net} \\ \hat{r}_{int}^{net} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \bar{\varphi}_{ech} \\ \bar{P}_{ana} \\ 0 \end{vmatrix}$$

6.4. Résolution : utilisation comme simulateur

La résolution en tant que simulateur se fait selon un algorithme d'optimisation avec comme fonction cible la maximisation et ou la minimisation d'un critère pouvant porter sur les rendements, les flux net de réaction, les bilans tel que présenté ci-dessus ou toute combinaison de ces grandeurs respectant les deux contraintes imposées $\hat{r}_{ana}^{net} - \mu \cdot \bar{P}_{ana} = 0$ et $\hat{r}_{int}^{net} = 0$.

Exemple : consommation de glucose minimale pour satisfaire aux besoins en précurseurs anaboliques (carbone et énergie) sous contrainte métabolique correspondant à la minimisation de tous les flux d'échange entre mitochondrie et le cytosol via les navettes de transfert des intermédiaires du cycle des TCA et maximisation du rendement de conversion de glucose en biomasse.

		μmol / g Biomasse		
ATP		Flux total	/ Total	ATP net
Total	Production	58 846		36 425
	Oxydatif	37 111	63.1%	
	PLS	21 735	36.9%	
Total	Consommation	58 846		%/ ATP net
	Catabolisme	22 420	38.1%	
	Anabolisme	36 425	61.9%	100.0%

RENDEMENTS		
Carbone Consommé	54.176	mmol consommé/gx
BIOMASSE	0.615	g/g glucose
OXYGENE	169.6	mmol/Cmol consommé
CO2	243.4	mmol/C mol consommé
NH3	119.0	mmol/C mol consommé
RAPPORT C/N	8.73	C consommé/N consommé
RAPPORT C/P	82.31	C consommé/P consommé
RAPPORT C/S	2 216.72	C consommé / S consommé
Biomasse C/C	0.731	Cmol/Cmol conso

Partie 4 : Résultats

Chapitre I : Devenir du carbone en conditions de croissance à partir de xylose et glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose.

Comme reporté dans l'analyse bibliographique *R. glutinis* est une levure oléagineuse connue pour ses capacités record d'accumulation lipidique à partir de glucose comme source carbonée (Granger, 1992, Cescut, 2009). Alors que la diversification des matières premières se présente comme une alternative prometteuse pour l'industrie des biocarburants, le métabolisme de cette levure oléagineuse à partir de substrats alternatifs demeure peu étudié. Dans ce premier chapitre, les travaux focalisent sur l'étude du devenir du carbone lors de cultures de *R. glutinis* en condition de croissance à partir du xylose et du glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la diversification des substrats carbonés, la démarche expérimentale est associée, de façon préliminaire, à une démarche de modélisation métabolique prédictive de manière à déduire une stratégie expérimentale pour explorer des potentiels points de fonctionnement métaboliques d'intérêt.

1. Etude prédictive des flux de carbone intracellulaires par modélisation métabolique

1.1. Composition de la biomasse.

Lors de travaux antérieurs de l'équipe FAME, l'analyse de la composition élémentaire de la biomasse en éléments carbone, hydrogène, oxygène, azote, phosphore et soufre a été réalisée sur des cellules en phase exponentielle de croissance (données initiales) et sert comme base pour initialiser l'étude. Les résultats sont reportés dans le Tableau 42.

Tableau 42 : Composition élémentaire de *Rhodotorula glutinis*.

Composition de la biomasse	Données initiales	Composition estimée à partir du descripteur métabolique
C	1,000	1,000
H	1,758	1,751
O	0,537	0,515
N	0,150	0,157
S	-	0,0006
P	-	0,0176
Masse molaire CHON / gX	24,193	24,193
Masse molaire CHONPS / gX	24,757	24,757
Masse molaire / gX	25,261	25,261
redox / gX	4,339	4,340

La composition macromoléculaire de la biomasse est une donnée indispensable à intégrer au descripteur métabolique ; cette composition est issue de données bibliographiques (Atkinson and Mavituna, 1992, Alroy *et al.*, 1977 ; Kaneko *et al.*, 1976, Elinoy *et al.*, 1970) et de résultats issus de travaux de recherche antérieurs menés par l'équipe FAME ; ces données sont consignées dans le Tableau 43. Pour assurer la cohérence des données, la composition élémentaire et la composition macromoléculaires sont réconciliées l'une par rapport à l'autre à l'aide du descripteur métabolique. Les valeurs sont récapitulées respectivement dans les tableaux 42 et 43 (désignées dans chaque cas par composition estimée). L'écart est très faible entre valeur mesurée et estimée ; on retiendra donc la formule élémentaire estimée reportée dans le Tableau 42 et la composition macromoléculaire correspondante dans le Tableau 43.

Tableau 43 : Composition macromoléculaire de la biomasse.

Composition biomasse	Données initiales (% biomasse organique)	Composition biomasse (% biomasse organique)
Protéines	41.0%	35.65%
ARN	13.0%	13.44%
ADN	5.0%	2.76%
Phospholipides	8.0%	8.12%
Polysaccharides	9.0%	23.02%
Triglycérides	4.6%	6.89%
Stérols	4.00%	2.84%
H₂O	4.00%	5.08%
CO₂	1.00%	0.66%
Précurseurs libres	4.00%	1.53%
Cendres	8.00%	4.41%

Il est alors possible d'estimer, comme suit, les demandes anaboliques en précurseurs carbonés, en énergie et coenzymes à partir de la stœchiométrie des voies de biosynthèse des monomères constitutifs de la biomasse catalytique et de sa composition macromoléculaire.

1.2. Modélisation du métabolisme de croissance via les flux de carbone intracellulaires.

La modélisation des flux de carbone intracellulaires vise à étudier de manière stœchiométrique le métabolisme de *Rhodotorula glutinis* en condition de croissance. L'objectif de cette partie du travail est de quantifier la demande en carbone nécessaire pour satisfaire les besoins anaboliques, cataboliques, énergétiques et en pouvoir réducteur nécessaires à la stœchiométrie de croissance de la souche. Ces calculs sont réalisés avec un descripteur métabolique prenant en compte soixante-quatre réactions et développé au sein de l'équipe FAME tel que décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes (Cf. paragraphe Le descripteur

métabolique page 107). La résolution se fait sous l'application de contraintes, dans un modèle simplifié ne prenant pas en compte la compartimentation cellulaire.

La première contrainte est le rendement de conversion du carbone en biomasse, issu des travaux de J. Cescut et égal à $0,49\text{g.g}^{-1}$ de glucose soit $0.64\text{Cmol.Cmol}^{-1}$ (Cescut J., 2009). La seconde contrainte est la synthèse de cofacteurs considérée comme un point clé dans l'assimilation et le catabolisme des substrats carbonés étudiés. Celle-ci permet d'envisager plusieurs scénarii. Ainsi, en fonction de l'importance relative des réactions génératrices de NADPH, H^+ , les simulations permettent l'obtention de cartes détaillées sur la Figure 25 où :

- le schéma a) correspond à un flux de carbone minimum dirigé vers la voie des pentoses phosphates satisfaisant la demande anabolique en phospho-ribosyl-pyrophosphate (PRPP) et erythrose-phosphate ; dans ce cas le rendement énergétique Y_{ATP} calculé est de 14,82 ; la fraction du flux d' α -D-glucose-6-phosphate allant vers le cycle des pentoses-phosphate ramené au flux net catabolisé est estimée à 13%.
- le schéma b) correspond à une activité de l'enzyme malique, qui est le déterminant principal, minimale avec une valeur du rendement énergétique Y_{ATP} de 12.77. La fraction du flux d' α -D-glucose-6-phosphate allant vers le cycle des pentoses-phosphate ramené au flux net catabolisé est estimée alors à 71%.
- le schéma c) correspond à une fraction du flux d' α -D-glucose-6-phosphate allant vers le cycle des pentoses-phosphate ramené au flux net catabolisé de 33%. Selon la littérature, c'est la valeur admise pour *S. cerevisiae*, Cette simulation correspond à un rendement énergétique de 14.04.

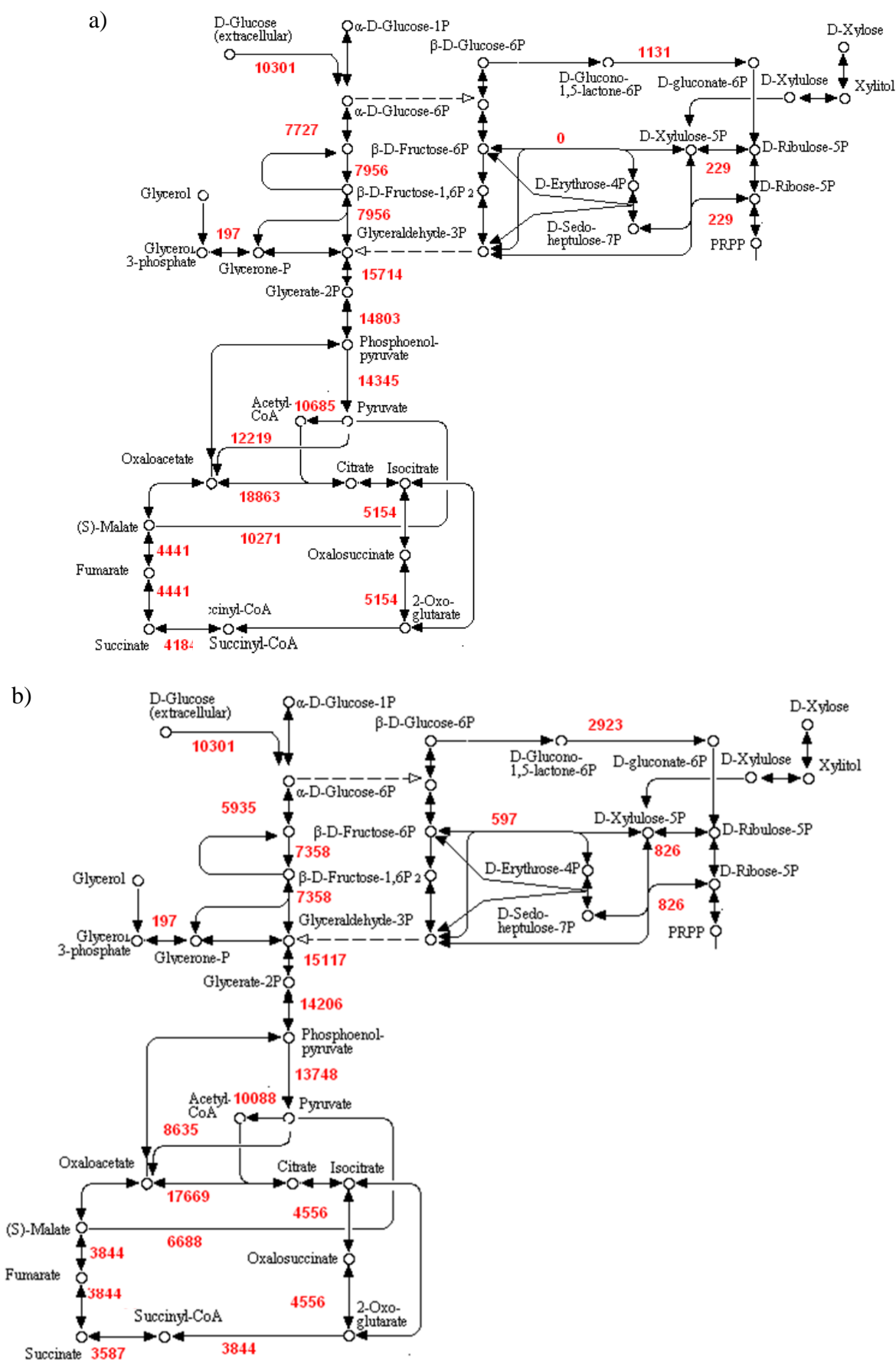


Tableau 44 : Scénarios métaboliques envisagés de co-consommation du glucose et de glycérol.

PGA : phosphoglycérate, PEP : phosphoénolpyruvate, OAA : Oxaloacétate, aKg α -cétoglutarate.

Glycérol	hypothèse (a)	hypothèse (b)	hypothèse (c)
demande anabolique en glycerol-phosphate + PGA + PEP	8%		
demande anabolique en glycerol-phosphate + PGA + PEP + pyruvate	16%		
demande anabolique en glycerol-phosphate + PGA + PEP + pyruvate + Acétyl-CoA	34%		
demande anabolique en glycerol-phosphate + PGA + PEP + pyruvate + Acétyl-CoA + OAA + aKG + Succinyl-CoA	53%		
demande pour glycolyse à partir des trioses-phosphate + TCA	76%	68%	73%
demande pour glycolyse à partir de triose P+ TCA +Voie pentose P+ pentose P + erythrose P	86%	86%	86%
Glycérol	hypothèse (a)	hypothèse (b)	hypothèse (c)

De même, pour le xylose, il est possible d'envisager des scenarii dans l'hypothèse où la consommation satisfait en premier lieu les demandes anaboliques, puis les flux glycolytiques avant la réaction catalysée par la fructose-1,6-bisphosphatase, phase terminale de la voie gluconéogénique générant le NADPH, H⁺ et finalement le glucose-phosphate. Dans cette logique, les ratios graduels (C_{xylose}/C_{total}) sont reportés dans le Tableau 45.

Tableau 45 : Scénarios métaboliques envisagés de co-consommation du glucose et du xylose.

PGA : phosphoglycérate, PEP : phosphoénolpyruvate, OAA : Oxaloacétate, aKg α -cétoglutarate

Xylose	Hypothèse (a)	Hypothèse (b)	Hypothèse (c)
demande en pentose-phosphate	5%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate	7%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + Glycérol-phosphate	8%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + Glycérol -phosphate + PGA	12%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + Glycérol -phosphate + PGA + PEP	15%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + Glycérol -phosphate + PGA + PEP + pyruvate	23%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + Glycérol -phosphate + PGA + PEP + pyruvate + Acétyl-CoA	41%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + GlyP + PGA + PEP + pyruvate + Acétyl-CoA	53%		
demande en pentose-phosphate + erythrose-phosphate + Gly-phosphate + PGA + PEP + pyruvate + Acétyl-CoA + OAA + aKg + Succinyl-CoA +TCA	78%	73%	77%

Conclusion.

Afin de progresser dans l'exploration et la compréhension des phénomènes métaboliques de la consommation du xylose ou du glycérol purs ou en mélanges avec du glucose, un modèle métabolique a été utilisé de manière prédictive. A partir d'hypothèses sur

le rendement carbone et sur l'importance relative des voies métaboliques génératrices de NADPH, H⁺ dans l'approvisionnement en cofacteurs, la simulation a permis de calculer des stratégies d'alimentation en co-substrats de manière à satisfaire théoriquement les besoins de la souche, et à identifier de potentiels points métaboliques clés. Ainsi, le co-substrat pourrait être progressivement alimenté par ratios successifs selon des ratios $C_{\text{cosubstrat}}/C_{\text{total}}$ proches de ceux mis en évidence par l'étude prédictive, avant d'être apporté comme seul substrat carboné. Cette approche argumente de la nécessité de développer une stratégie expérimentale de culture permettant le contrôle des flux et concentrations en sources carbonées pour la quantification et la caractérisation du comportement dynamique métabolique de *R. glutinis* sur des substrats simples xylose et glycérol et co-substrats glucose-xylose et glucose-glycérol. Des cultures en mode fed-batch sont donc réalisées et les résultats présentés ci-après.

2. Etude comparative de l'assimilation par *Rhodotorula glutinis* du xylose et du glycérol en simples ou co-substrats avec le glucose en condition de croissance. Publication :

Cette partie est présentée sous forme de publication qui va être soumise à un journal international avec comité de lecture.

Maud Babau^{a,b,c}, Jean-Louis Uribe Larrea^{a,b,c} and Carole Molina-Jouve^{a,b,c*}

a) Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

b) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

c) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

*corresponding author. Address : 135, avenue de Rangueil, 31400 Toulouse France. Tel. : +33 (0) 5 61 55 94 47.

E-mail addresses: maud.babau@gmail.com, jean-louis.uribelarrea@insa-toulouse.fr; carole.jouve@insa-toulouse.fr.

Keywords

Rhodotorula glutinis, *Rhodospiridium toruloides*, oleaginous yeast, xylose, glycerol, glucose, co-consumption, growth, fed-batch.

Introduction

Considering the recent certification of hydrotreated oils, lipid-based biofuels are a credible alternative to fossil jet fuel. Lipids are currently extracted from oleaginous plants, but they can also be produced by oleaginous microorganisms. There is a high biological diversity of oleaginous micro-organisms: species of algae, bacteria, fungi and yeast are able to accumulate lipid from 20% to 86 % of their dry cell weight (Meng *et al.*, 2009, Xu *et al.*, 2006, Sheehan *et al.*, 1998, Boulton and Ratledge 1984, Metting *et al.*, 1996, Ratledge, 1982). Considering carbon to lipid yield, lipid productivity, lipid profile and content, yeast species are excellent candidates for lipid production. *Rhodotorula glutinis*, also called *Rhodospiridium toruloides*, is a yeast of major interest, and has been demonstrated to accumulate lipids up to 70% of its dry cell weight, using glucose as carbon substrate under conditions of nitrogen limitations or depletions (Cescut *et al.*, 2014, Granger *et al.*, 1992, Davies *et al.*, 1990).

From the perspective of industrial lipid production, many research works focus on the use of alternative feedstocks as carbon sources. Considering economic and environmental aspects, lignocellulosic resources and industrial by-products such as glycerol are promising raw materials. Lignocellulose is a renewable, ubiquitous material used by paper, agriculture and food industries (Lee *et al.*, 1997). For the past decade, a significant amount of international research has targeted the pretreatment and valorisation of lignocellulosic substrates, with the goal of converting such materials into fermentable carbon sources (Alvira *et al.*, 2009; Carvalheiro *et al.*, 2008; Hendriks and Zeeman, 2008; Laureano-Perez *et al.*, 2005; Malherbe and Cloete, 2004; Taherzadeh and Karimi, 2008). Lignocellulose is the main component of plants, which are the largest reservoir of the fermentable carbohydrates glucose and xylose (Gibson *et al.* 2012; Harris and Stone 2008; Pauly and Keegstra 2008, Zhao *et al.*, 2008). While glucose is the most commonly utilized substrate for industrial fermentation processes, utilization of xylose as a carbon source is not a common practice for industrial fermentation. In order to enable the effective use of lignocellulosic feedstocks, it is therefore important to develop bioprocesses which can efficiently utilize xylose or xylose and glucose mixtures as carbon source .

Another interesting carbon substrate is glycerol. According to development of biodiesel industry to target low CO₂ emissions, glycerol is the major by-product as shown on the equation 1. It could be used as a carbon source for microbial conversion (Li *et al.*, 2008, Fakas *et al.*,

2009, Easterling *et al.*, 2009, Liang *et al.* 2010). Moreover, within the integrated biorefinery concept where the glycerol produced in-situ would be recycled as an alternative carbon source. This internal recycle would allow a global increase of the carbon yield and could significantly decreases costs of lipid production.



In this context, the aim of this study is to investigate growth capacities of *Rhodotorula glutinis* using xylose and glycerol either as sole carbon source or in mixtures with glucose. Although a few studies describing lipid production potential of the strain from lignocellulosic hydrolysates let to believe that the yeast is able to consume xylose (Dai *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2010, Easterling *et al.*, 2009, Wiebe *et al.*, 2012, Mast *et al.*, 2014), the simultaneous uptake and catabolism of glucose and xylose or glycerol under growth condition is not reported in the literature for the strain studied. Also, growth of *R. glutinis* (*Rhodospiridium toruloides*) on xylose or glycerol as single carbon source is very poorly characterized in a controlled fed-batch mode. However, the physiological dynamics whose pentose consumption kinetics are not described. Metabolism of strain *R. glutinis* from this alternative sugar under optimal growth conditions remains to be explored. Similarly studies about the potential of lipids accumulation from glycerol reveal indirectly the ability of the strain to consume this substrate (Easterling *et al.*, 2009, Saenge *et al.*, 2010, Yen *et al.*, 2012, Yang *et al.* , 2014) however no kinetic characterization and no effect on performance is the reported for the strain grown on this substrate.

Further investigations are then needed to improve the understanding of *Rhodotorula glutinis* metabolism on xylose and glycerol as sole substrates or as co-substrates with glucose in order to precisely quantify the microbial phenomena. Fed-batch cultures under perfectly controlled conditions were designed to explore, in an original way, the yeast behaviour on a large range of carbon ratios of the relevant substrates. The dynamic and metabolic responses of the strain when switching from a carbon ratio to another one are also reported and discussed and all the results are analysed in terms of kinetics and yields.

Materials and methods

1.1 Reagents

1.1.1 Microorganism

The yeast strain used was *Rhodotorula. glutinis* (also called *Rhodospiridium toruloides*) wild type CECT 1137, supplied by the Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), University of Valencia, Spain.

1.1.2 Culture media

Before fermenter inoculation, three pre-cultures of 12 h each were carried out in Erlenmeyer flasks containing successively 5 mL of Yeast extract Peptone Dextrose medium, 50 mL and finally 500 mL of the mineral medium described in Table 1, at 30 °C on a rotary shaker (100 rpm).

For fed-batch culture, glucose feed concentration was 700 g.L⁻¹, xylose feed concentration 545 g.L⁻¹, glycerol feed concentration 730 g.L⁻¹.

The composition of the mineral medium is described in Table 1.

Table 1: Mineral medium composition (g.L⁻¹)

KH ₂ PO ₄	4.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.83
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,710
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.7
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.016
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.070
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0029
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0031
Na ₂ MoSO ₄ .2H ₂ O	0.0012
H ₃ BO ₃	0.010
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.018
NaCl	0.039
glucose	20

The composition of the concentrated salts solution is described in

Table 2. It was supplemented with 1 ‰ of the following vitamin solution: d-biotin: 0.05 g.L⁻¹, thiamine hydrochloride: 1 g.L⁻¹, pantothenic acid: 1 g.L⁻¹, pyridoxol hydrochloride: 1 g.L⁻¹, nicotinic acid: 1 g.L⁻¹, p-aminobenzoic acid: 0.2 g.L⁻¹, myo-inositol: 25 g.L⁻¹.

Table 2 : Concentrated salt solution composition (g.L⁻¹).

MgSO ₄ .7H ₂ O	36
MnSO ₄ .H ₂ O	0.10
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.09
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.30
FeSO ₄ .7H ₂ O	3
H ₃ PO ₄	90.73
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.14
H ₂ SO ₄	212.57
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.04
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.49
NaCl	10
KCl	55.83

During fed-batch culture, vitamins were manually and sequentially added from a concentrated vitamins solution (cf. composition above) proportionally to the carbon fed. pH regulation was carried out with the addition of ammonium hydroxide solution (16 mol.L⁻¹ of ammonia equivalents).

Glucose was provided by Roquette (France). Xylose was supplied by Danisco (France). Glycerol and vitamins were all purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Lyons, France) with a purity of at least 99.9%. All other chemicals were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) with a purity of at least 99%.

1.2 Operating conditions

1.2.1 Reactor

Fed-batch experiments were performed in a 20 L (working volume) fermenter using the Braun Biostat E fermenting system (Braun, Biostat E, Braun Diessel, Biotech, Melsungen, Germany) which was sterilizable in situ. Mixing was performed with a three Rushton turbines system. The reactor was instrumented with the following probes: a pressure sensor, a temperature sensor, an oxygen probe (Ingold, Urdorf, Switzerland) and a pH probe (Fermprobe Broadley-James Co., Santa Ana, USA). An overpressure of 0.3 bar was maintained in the reactor. Temperature setpoint was 30 °C. Dissolved oxygen concentration was maintained in the non-limiting range (above 20% of saturation) by manual adjustment of stirring and aeration flow. Before starting cultures, mineral medium was initially added in the fermenter with 10 mL vitamin solution (see composition below) and pH was adjusted to 5.5 with phosphoric acid. During cultures, pH was maintained at 5.5 by automatic addition of ammonium hydroxide. An

anti-foaming agent (Struktol ®J673) was added automatically as necessary with an antifoam probe inserted through the top plate of the reactor. Two pumps providing a very precise flow were dedicated to the addition of substrates into the reactor. A third pump fed the concentrated salt solution, at a ratio 1/10 of total carbon fed. They were controlled through the software detailed in section 1.2.2. The masses of substrates added were estimated from the change in weight of the substrate containers (balances model 12000 and I GP5202 Sartorius Goettingen, Germany) using the software described in Section 2.2. The compositions of the inlet and outlet gases were analyzed by a gas analyzer with an infrared detector for carbon dioxide and a paramagnetic detector for oxygen (Egas 8, Braun, Germany). From all these signals, the respiratory coefficient defined as $QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}}$ was calculated on line.

1.2.2 Control software

A homemade custom software enabled on-line data acquisition, monitoring and regulation of operating parameters (stirring rate, pH, temperature, partial pressure of dissolved oxygen, base and antifoam additions). Oxygen consumption rate and carbon dioxide production rate were calculated from mass balances, taking into account the evolution of the gas volume in the reactor, inlet airflow (measured by a mass flowmeter, Brooks, USA), temperature, humidity and pressure. The residual substrate concentration in the fermenter was calculated, based on carbon mass balances and redox balances and taking into account on-line acquisition data.

1.3 Analytical methods

1.3.1 Biomass concentration

Yeast concentration was quantified by spectrophotometric measurement at 600 nm (Spectrophotometer Hitachi U-1100, range 0.1-0.5 uOD) and by cell dry weight measurements (filtration of a sample with 0.45 µm membrane, washing of the cells with distilled water, drying at 60 °C/200 mmHg for 48 h).

1.3.2 Concentrations of substrates and extracellular metabolites

Determination of the organic acids, glycerol and sugar concentrations from supernatants was performed by HPLC using an Aminex HPX-87H⁺ column (300 mm × 7.8 mm) under the following conditions: 50 °C, with 5 mM H₂SO₄ as eluent (flow rate of 0.5 mL.min⁻¹) and dual

detection (refractometer and UV at 210 nm). Compounds were identified and concentrations were quantified with reference to standards.

During cultures, residual glucose concentration was also determined in culture supernatants with a glucose analyzer YSI model 27 A; Yellow Springs Instruments.

1.3.3 Biomass composition

The biomass formula, determined by elemental analysis of carbon, hydrogen, oxygen and nitrogen, is $\text{CH}_{1.79}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.16}$ with a corresponding molar mass of 25.2 g.Cmol^{-1} . For all experiments, carbon mass balances were calculated and were recovered with a deficit of less than 5%.

1.4 Culture Strategy

In order to investigate the dynamic metabolic behaviour of the yeast *Rhodotorula glutinis*, and the response of the strain when switching from one carbon source to another, fed-batch experiments were performed with exponential carbon feed rates organized in four feeding phases: first, pure glucose was fed only in order to produce enough biomass to get the study started; second mixtures of glucose and co-substrate (either xylose or glycerol) were applied in different ratios adjusted by steps and defined by : $\text{Carbon ratio} = \frac{\text{Carbon cosubstrate}}{\text{Carbone total fed}}$, third, pure co-substrate was fed (xylose or glycerol); and finally, pulses of glucose while feeding pure co-substrate were set-up. This last phase was realized in order to evaluate the reversibility of metabolism response, its adaptation from one substrate to another one and also to evaluate the impact of carbon excess that occurred under these conditions. All of first three phases were performed in fed-batch cultures for growth quantification purposes without any nutritional limitation; carbon substrate was supplied with an exponential feeding rate and with a residual carbon concentration near zero.

Results

1.1 Carbon Co-consumption and metabolites production.

The results of the fed-batch experiments on glucose and xylose as co-substrate with glucose are shown in Figure 1. The phase I) enabled to produce a biomass concentration high enough (around 5 g.L^{-1}) to precisely quantify yeast metabolic behaviour when applying the different substrate carbon ratios explored in phase II. During phase II, xylose was gradually fed and the following ratios of carbone where applied: 9%, 20%, 28%, 38%, 53% and 70%. At the end of phase II, biomass concentration was around $80 \text{ g}_{\text{CDW}}.\text{L}^{-1}$. During the 5 first ratios of

this phase, no substrate excess occurred and no by product (xylitol or organic acids) was produced as it is shown in Figure 2. This observation underlines the co-consumption capacity of *R. glutinis* under controlled conditions: when the carbon flux fed remained underneath the maximal capacity of the strain, both xylose and glucose were consumed and no extracellular metabolite was produced. Up to $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylitol were produced during the 70% ratio. Phase III corresponded to xylose feeding only. At the beginning of the phase, around 38 hours, xylitol was produced (Figure 2). A decrease of total carbon fluxes fed by maintaining the ratio (both glucose and xylose) avoided further xylitol production and also allowed already produced xylitol consumption. This observation shows the direct correlation between carbon overflow and xylitol production under these culture conditions. After 4 hours of cultivation with xylose as a sole substrate, biomass concentration was around $110\text{g}_{\text{CDW}}\cdot\text{L}^{-1}$. At 53 hours of elapsed fermentation time, a glucose pulse was made (phase IV, it is indicated on the graph by an arrow). Consequently, glucose was preferentially consumed since the residual xylose concentration reached 4g/L at the highest; despite this preference co-consumption was carried on and xylitol was produced at a concentration up to $8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. This result emphasizes that within carbon excess, in presence of glucose and xylose, glucose was consumed and metabolized while xylose is partially transformed in xylitol: the part of carbon brought by xylose was in this case not catabolized to produce biomass.

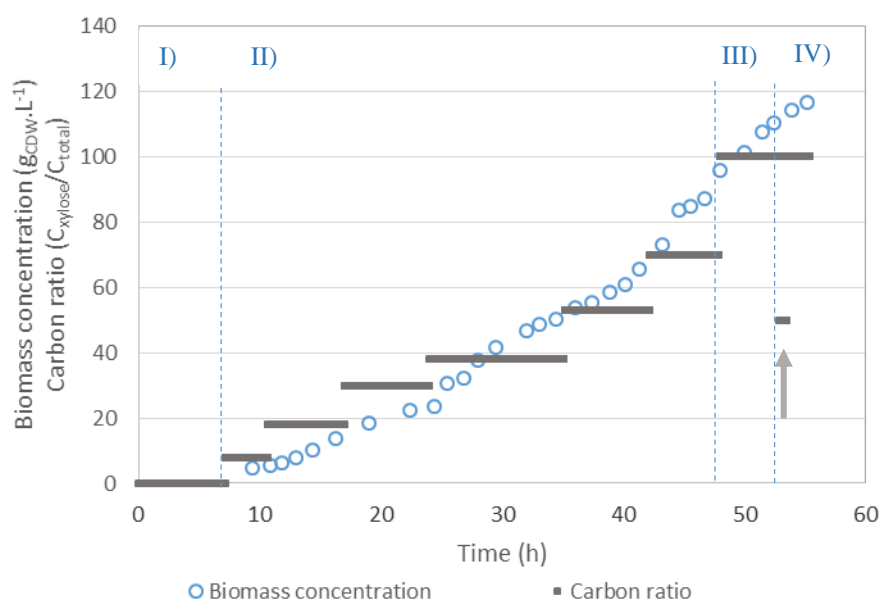


Figure 1 : Carbon ratio and dry cell weight evolutions versus time during fed batch culture of *R. glutinis* on glucose and xylose, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5.

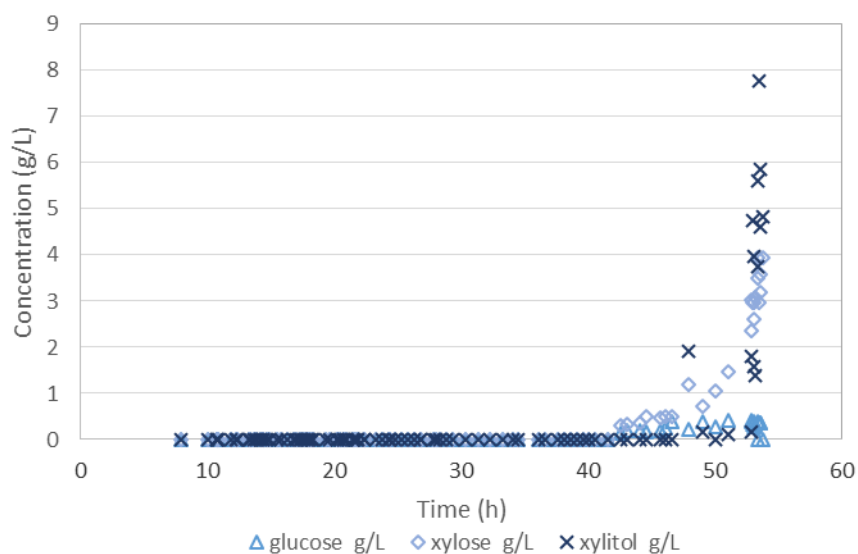


Figure 2 : Evolutions of residual sugars and xylitol concentrations versus time during fed batch culture of *R. glutinis* on glucose and xylose, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5.

Although xylitol production was never previously reported in the literature for *Rhodotorula glutinis*, it is well known for *Candida*, *Pichia sp.* or in *Saccharomyces cerevisiae* mutants when grown on xylose (Slininger *et al.*, 1985, Kötter *et al.*, 1993, Winkelhausen E. and Kuzmanova S., 1998, Zikou *et al.*, 2013, Erdei *et al.*, 2013;). Xylitol is indeed an intermediate metabolite of xylose catabolism: after being uptaken xylose is first reduced in xylitol by the NADPH-dependant xylose reductase ; it is then oxidised in xylulose by the NAD⁺-dependant xylose dehydrogenase, and then phosphorylated in xylulose-5-phosphate that joins the PPP (Evans *et al.*, 1984, Suomalainen *et al.*, 1989, Kötter *et al.*, 1993, Jeffries *et al.*, 2006, Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). The coenzyme balance is essential for xylose assimilation. As a consequence xylitol synthesis might be explain by an incapacity of the strain to properly regenerate or distribute cofactors when intracellular carbon fluxes are too high in the PPP, as there seem to be an excess of NADPH₂. However, as xylitol is uptaken and further metabolised in xylulose, NADPH₂ availability does not seem to be limiting, as NAD⁺ needed to produce xylulose seems here to be the bottleneck.

In a similar way, experiments were carried out with glycerol as a co-substrate as it is recapped in Table 3. After the production of 5g_{cdw}.L⁻¹ in the first phase, the second phase was started; the ratios investigated were then 8%, 10%, 22%, and 75%. During this phase and until 30 hours of elapsed fermentation time both of the carbon sources, glucose and glycerol were co-consumed and no by-product was produced. However when the last ratio was applied

glycerol accumulation occurred (while glucose concentration remained below the limit of quantification); at this time, the carbon fluxes fed were above the maximal uptake potential of the strain. A readjustment of the feeding rates allowed glycerol consumption. This observation confirmed that in presence of both glucose and glycerol and under carbon excess, glucose is preferentially uptaken. On the opposite of what was observed with xylose, where xylitol production occurred in the case of carbon excess, glycerol is uptaken only if it can be further catabolized; no metabolite production was quantified under glycerol excess. At the end of phase II, biomass concentration was near $80\text{g}_{\text{CDW}}\cdot\text{L}^{-1}$. During phase III, glycerol was consumed as a sole substrate and final biomass concentration at the end of this phase was $98\text{g}_{\text{CDW}}\cdot\text{L}^{-1}$.

Table 3 : Phases applied during the fed batch culture of *R. glutinis* on glucose and glycerol, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5.

	Phase I	Phase II	Phase III
<i>Ratios ($C_{\text{xylose}}\cdot C_{\text{total}}^{-1}$)</i>	0%	8%, 12%, 25%, 75%	100%
<i>Duration (h)</i>	8.5	28.5	7.5
<i>Biomass concentration</i> ($\text{g}_{\text{cdw}}\cdot\text{L}^{-1}$)	5	80	98

1.2 Metabolism response/Adaptation to new ratios

It is interesting to observe the response of the strain when switching from a feeding ratio to another one. Concerning the glucose-xylose co-feeding experiments, residual xylose and glucose concentrations remained below the limit of quantification during phase II and from phase II to phase III (Figure 2). As a consequence, no carbon substrate accumulation and no by-product formation was noticed when changing the ratio fed. It means that the total carbon flux fed is uptaken and no transient phase was observed between any of the conditions studied. The strain was able to adapt immediately.

During glucose-glycerol co-feeding experiments, the respiratory coefficient was an excellent indicator of substrate uptake: as glycerol is more reduced than glucose, its uptake led to a decrease of the respiratory coefficient. Results are shown in Figure 3: when increasing the carbon ratio from 12 to 75 %, the respiratory coefficient dropped from a stabilized value of 1.06 to a stabilized value 0.96. The microbial response occurred immediately.

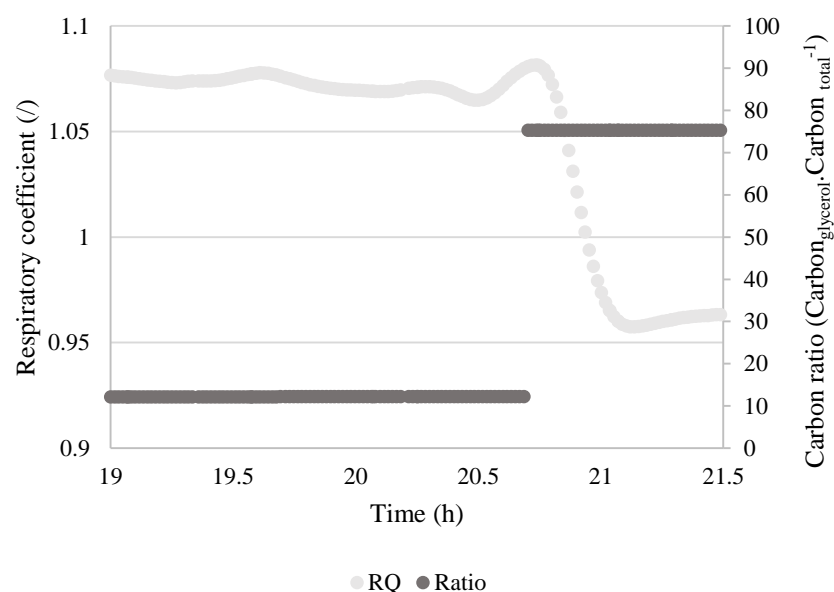


Figure 3: Respiratory coefficient versus time during the culture of *R. glutinis* in fed batch mode with glucose and glycerol as carbon substrate, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5.

These observations revealed the short adaptation rate of the strain when switching from a co-feeding condition containing a carbon ratio to another one, both with xylose and glycerol as co-substrate.

1.3 Kinetics and yields

The evolution of total specific carbon consumption rates as a function of the carbon ratio on glucose-xylose mixtures were reported in Table 4: in a first step, the decrease of the total specific carbon consumption rate observed as xylose was gradually added was striking as it goes from 0.3 to 0.10 $C_{\text{molsubstrate}} \cdot C_{\text{molbiomass}} \cdot h^{-1}$ when the ratio goes from 8.7 to 38% ; in a second step it stabilizes around 0.11 $C_{\text{molsubstrate}} \cdot C_{\text{molbiomass}} \cdot h^{-1}$ (Table 4). Moreover, during the last ratio of phase II (70%) and during phase III (100%), as mentioned earlier, a carbon accumulation occurred; the maximum specific carbon consumption rate of the strain was then obtained. Its value was 0.12 $C_{\text{molsubstrate}} \cdot C_{\text{molbiomass}} \cdot h^{-1}$. The carbon conversion yield on biomass was reported in Table 4 : it decreased from 67% to 28% along the experiment. A similar trend was observed on the growth rate : it decreases from 0.20 to 0.05 h^{-1} between the ratios 9 and 70%. This trend could be explained in terms of metabolism either by a decrease of energy efficiency correlated to the effect of xylose assimilation on cofactors imbalances.

Table 4: Growth rate, specific carbon consumption rate and substrate to biomass carbon yield for each carbon ratio applied during a fed batch culture of *R. glutinis* on glucose and xylose, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5.

Ratio ($C_{xylose} \cdot C_{total}^{-1}$)	9%	20%	28%	38%	53%	70%	100%
μ (h^{-1})	0.20	0.14	0.12	0.06	0.04	0.05	0.03
$Y_{s,x}$ ($C_{biomass} \cdot C_{substrate}^{-1}$)	0.67	0.64	0.61	0.60	0.57	0.42	0.28
q_s ($C_{substrate} \cdot C_{biomass} \cdot h^{-1}$)	0.3	0.22	0.20	0.10	0.07	0.12	0.12

Furthermore and as there was a xylose accumulation when this substrate was used as a sole carbon substrate, the maximum specific growth rate on xylose was $0.03h^{-1}$, which represented eight times less than the value reported on glucose (Granger, 1992).

Table 5: Growth rate, specific carbon consumption rate and substrate to biomass carbon yield for each carbon ratio applied during a fed batch culture of *R. glutinis* on glucose and glycerol, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5.

Ratio ($C_{glycerol} \cdot C_{total}^{-1}$)	8%	12%	25%	75%	100%
μ (h^{-1})	0.14	0.11	0.10	0.10	0.04
$Y_{s,x}$ ($C_{biomass} \cdot C_{substrate}^{-1}$)	0.60	0.58	0.59	0.59	0.31
q_s ($C_{substrate} \cdot C_{biomass} \cdot h^{-1}$)	0.23	0.19	0.17	0.17	0.13

The evolution of specific carbon consumption rates, yields substrates to biomass and specific growth rate during glucose -glycerol co-feeding experiment are reported Table 5. During phases II and III growth rate is decreasing from 0.14 to $0.04 h^{-1}$ when ratio increases from 8% to 100% : growth kinetics are negatively affected by the increasing uptake of glycerol. All along phase II, yields are stabilized around $0.6 C_{molbiomass} \cdot C_{molsubstrate}^{-1}$. As a consequence, as far as glycerol is co-fed, stoichiometry is maintained. However, during phase III (100%) when only glycerol is supplied yield substrate to biomass decreases significantly to $0.31 C_{molbiomass} \cdot C_{molsubstrate}^{-1}$. This observation could find the following metabolic explanation: when glucose is fed it can supply the glycolytic fluxes; as soon as glycerol only is fed neoglucogenesis has to be initiated. Its energetic cost (2ATP) and its impact on coenzymes imbalance could explain the decrease of the yield. Concerning carbon specific rate, there is a factor 2 between the first ratio of phase II and phase III.

Rhodotorula glutinis growth was characterized on glucose in terms of maximal specific growth rate and corresponding yield (Granger, 1992). From these values, using the equation 2, maximal specific rate was estimated. Data are recapped on Table 6.

$$qs = \frac{\mu}{Y_{x,s}} \text{ Equation 2.}$$

Using xylose or glycerol affect both yields and kinetics by comparison to the results obtained on glucose. But in both cases a 20% mixture allows to keep a high yield and correct kinetics.

Table 6: Growth rate, specific carbon consumption rate and substrate to biomass carbon yield during a culture of *R. glutinis* on glucose, on minimum media, at 30 °C, pH 5.5, (d'après Granger, 1992).

$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.27
$q_{s,\max} \text{ (C}_{\text{substrate}} \cdot \text{C}_{\text{biomass}} \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$	0.41
$Y_{s,x} \text{ (C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}\text{)}$	0.66

Conclusion

This study focused on the characterization of *R. glutinis* growth when using xylose or glycerol either as co-substrates with glucose or as sole carbon source from fed-batch cultures with several feeding phases where glucose-xylose respectively glucose-glycerol were fed in different ratios. The dynamic behaviour of *R. glutinis* was observed and quantified in terms of specific rates of xylose and glycerol as co-substrates or pure substrates and carbon to biomass conversion yield; metabolic response and adaptation time when shifting the carbon ratios were also investigated. It was shown for both substrates the yeast capacity of co-consumption under limiting carbon flux. A short adaptation time was also underlined in both cases: when applying a new carbon ratio, no transient adaptation phase was observed showing the metabolic flexibility of the strain. In both cases, it was shown the preference of the strain for glucose uptake in case of substrates excess. Consumption of xylose and glycerol as sole carbon source was also demonstrated. Moreover, in both cases it was shown the negative impact of the second carbon source in terms of yields and kinetics : growth rate was 0.034 h^{-1} on xylose, it was 0.04 h^{-1} on glycerol versus 0.27 h^{-1} on glucose ; maximal specific carbon rate on glucose was $0.40 \text{ C}_{\text{substrate}} \cdot \text{C}_{\text{biomass}} \cdot \text{h}^{-1}$, it was divided by 3 for both xylose and glycerol, finally yield glucose to biomass was $0.66 \text{ C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}$, it decreases to $0.28 \text{ C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}$ on xylose and to $0.31 \text{ C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}$ on glycerol. However using a substrate mixture containing respectively

28% of xylose or 25% of glycerol could be a good alternative as at this ratio yields were almost maintained (respectively $0.61C_{\text{biomass}} \cdot C_{\text{substrate}}^{-1}$ and $0.59C_{\text{biomass}} \cdot C_{\text{substrate}}^{-1}$) and kinetics were still correct. Moreover, it was shown as a main difference between xylose and glycerol assimilation that a carbon overflow led to xylitol production when xylose is fed and to glycerol accumulation in the case of glycerol feeding.

The demonstration of co-consumption capacities of the strain under growth conditions is a new step towards the use of lignocellulosic feedstocks and raw glycerol (industrial by-product) for the production of microbial lipids.

Acknowledgements

The authors thank the CNRS and Airbus Group for the financial support.

References

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2009. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 110, 4851–4861.

Boulton, C.A. and Ratledge, C., 1984. The physiology of hydrocarbon utilizing microorganisms. *Topics in Fermentation and Enzyme Technology* 9, 11-77.

Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F. M., 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67, 849-864.

Cescut, J., Fillaudeau, L., Molina-Jouve, C., Uribe Larrea, J.L., 2014. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnology for Biofuels* 7, 164-175

Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., Zhao, M., 2007, Biodiesel generation from oleaginous yeast with xylose assimilating capacity. *Afr J Biotechnol* 6, 2130–2134

Davies, R.J., Holdsworth, J.E., Reader, S.L., 1990, The effect of low oxygen-uptake rate on the fatty-acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum Curvatum*, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 33, 569-573.

Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M., 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol* 100, 356–368.

Erdei, B., Frankó, B., Galbe, M., Zacchi, G., 2013. Glucose and xylose co-fermentation of pretreated wheat straw using mutants of *S. cerevisiae* TMB3400. *J Biotechnol* 164,50-8

Evans, C. T., Ratledge, C., 1984. Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on xylose: the key to efficient xylose metabolism. *Archives of Microbiology* 139, 48-52.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., and Aggelis, G., 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass & Bioenergy* 33, 573-580.

Freer, S.N., Skory, C.D., Bothast, R.J., 1997, D-Xylose metabolism in *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology Letters* 19, 1119-1122.

Gibson, L.G., 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *J Royal Society Interface* 9,2749–2766.

Granger, L. M., 1992, Caractérisation cinétique et stœchiométrique de la synthèse d'acides gras chez *R. glutinis*, PhD Thesis/Thèse, Toulouse, INSA Toulouse.

Granger, L.M., Perlot, P., Goma, G., Pareilleux, A., 1992. Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 13–17.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 937-953

Harris, P.J., Stone, B.A., 2008 Chemistry and molecular organization of plant cell walls, in: Himmel, M.E. (Ed.), *Biomass recalcitrance*. Blackwell, Oxford, pp 60–93.

Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G., 2008. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10-18

Jeffries, T.W., 2006 Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 17, 320-6.

Kim, J.H., Block, D.E., Mills, D.A., 2010, Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 1077-1085.

Kötter, P., Ciriacy, M., 1993. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 776-783.

Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., and Dale, B.E., 2005. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 124, 1081-1099.

Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* 56, 1-24.

Li, Q., Du, W., Liu, D., 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 80,749–756.

Li, Q., Liang, L., Xue, F., Zhang, X., Tan, T., 2010. The Utilization of Xylose by Oleaginous Yeast *R. glutinis*. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 4, 53-57.

Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., Blackburn, J.W., 2010. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology* 101, 7581-7586.

Mast, B., Zöhrens, N., Schmidl, F., Hernandez, R., Todd French, W., Merkt, N., Claupein, W., Graeff-Hönninger, S. 2014. Lipid production for microbial biodiesel by the oleagenous yeast *Rhodotorula glutinis* using hydrolysates of wheat straw and miscanthus as carbon sources. *Waste and Biomass Valorization* 5 (6), 955-962.

Malherbe, S. and Cloete, T.E., 2004. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1, 105-114.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganism, *Renewable Energy* 34, 1-5.

Metting, F.B., 1996, Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 477–489.

Pauly, M., Keegstra, K., 2008. Cell wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54, 559–568.

Ratlledge, C., 1982. Single Cell Oil. *Enzyme And Microbial Technology*, 4, 58-60.

Salusjärvi, L., Kankainen, M., Soliymani, R., Pitkänen, J.P., Penttilä, M., Ruohonen, L., 2008. Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 7, 7 -18.

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T.T., and Bourtoom, T., 2011, Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids, *Process Biochemistry* 46, 210-218.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. Technical report, A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program—biodiesel from algae, National Renewable Energy Lab, U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, www.osti.gov.

Slininger, P.J., Bothast, R.J., Okos, M.R. , Ladisch M.R., 1985. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnology Letters* 7, 431-436.

Subtil, T. and Boles, E., 2012. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 5.

Suomalainen, I., Londesborough, J., Korhola, M., 1989, An Oxidoreductive Pathway for D-Xylose Assimilation by *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of General Microbiology* 135, 1537-1545.

Taherzadeh, M.J. and Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651.

Wiebe, M.G., Koivuranta, K., Penttilä, M. and Ruohonen, L., 2012. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology* 12.

Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S., 1998. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. *Journal of fermentation and bioengineering* 86, 1-14.

Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorellaprotothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499-507.

Yen, H.W., Yang, Y.C., Yu, Y.H., 2012. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J Biosci Bioeng.* 114, 453-456.

Zhang, G., French, W.T., Hernandez, R., Alley, E., Paraschivescu, M., 2011. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy* 35, 734 -740.

Zhao, X., Kong, X.L., Hua, Y.Y., Feng, B., and Zhao, Z.B., 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal Of Lipid Science And Technology* 110, 405-412.

Zikou, E., Chatzifragkou, A., Koutinas, A.A., Papanikolaou, S., 2013. Evaluating glucose and xylose as co-substrates for lipid accumulation and γ -linolenic acid biosynthesis of *Thamnidium elegans*. *J Appl Microbiol.* 114,1020-32

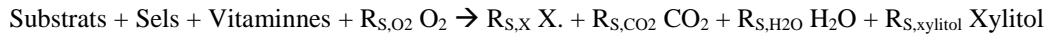
3. Influence du substrat carboné sur la composition macromoléculaire de *R. glutinis*.

L'influence du substrat carboné sur la composition macromoléculaire de la souche d'intérêt a été étudiée lors de cultures en mode fed-batch à partir de glucose et de xylose comme substrat. Cette caractérisation est faite par la confrontation du suivi en ligne du coefficient respiratoire avec les teneurs massiques en polysaccharides et lipides.

Le coefficient respiratoire est le quotient des vitesses de production de CO₂ et de consommation du dioxygène comme le décrit l'équation 77.

$$QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} \quad \text{Équation 77}$$

Or, cette production et cette consommation peuvent être reliées au métabolisme cellulaire selon l'équation réactionnelle suivante (d'après Cescut, 2009):



avec R_{S,O_2} , $R_{S,X}$, R_{S,CO_2} , R_{S,H_2O} , $R_{S,xylitol}$ et $R_{S,H}$ respectivement le rendement de consommation de dioxygène et de conversion du substrat en biomasse, dioxyde de carbone, eau et xylitol. Le bilan carbone de la croissance avec synthèse de xylitol répond alors à l'équation 78.

$$r_X^{net} + r_{S1}^{net} + r_{S2}^{net} + r_{xylitol}^{net} + r_{CO_2}^{net} = 0 \quad \text{Équation 78}$$

dans laquelle r_X^{net} , $r_{xylitol}^{net}$, $r_{CO_2}^{net}$, r_{S1}^{net} et r_{S2}^{net} représentent respectivement la vitesse nette de production de biomasse, de xylitol, de dioxyde de carbone et de consommation de substrat rapportées au volume total du système étudié. Soit une vitesse de production de dioxyde de carbone correspondant à :

$$r_{CO_2}^{net} = -r_X^{net} - r_{S1}^{net} - r_{S2}^{net} - r_{xylitol}^{net} \quad \text{Équation 79}$$

Le bilan élémentaire généralisé de la réaction biologique s'écrit en associant à chaque composé i un degré de réduction γ_i :

$$\sum_{j=1}^m r_j^{net} \cdot \gamma_j = 0 = r_{O_2}^{net} \cdot \gamma_{O_2} + r_X^{net} \cdot \gamma_X + r_{S1}^{net} \cdot \gamma_{S1} + r_{S2}^{net} \cdot \gamma_{S2} + r_{xylitol}^{net} \cdot \gamma_{xylitol} \quad \text{Équation 80}$$

$$\text{D'où on obtient : } r_{O_2}^{net} = \frac{1}{\gamma_{O_2}} \cdot (-r_X^{net} \cdot \gamma_X - r_{S1}^{net} \cdot \gamma_{S1} - r_{S2}^{net}) \quad \text{Équation 81}$$

La combinaison de $r_{CO_2}^{net}$ et de $r_{O_2}^{net}$ permet d'exprimer la valeur du quotient respiratoire selon l'Équation 82.

$$QR = \left| \frac{-(r_X^{net} + r_{S1}^{net} + r_{S2}^{net} + r_{xylitol}^{net})}{-\frac{1}{\gamma_{O_2}} (r_X^{net} \cdot \gamma_X + r_{S1}^{net} \cdot \gamma_{S1} + r_{S2}^{net} \cdot \gamma_{S2} + r_{xylitol}^{net} \cdot \gamma_{xylitol})} \right| \quad \text{Équation 82}$$

S'il n'y a pas de production de xylitol, on peut admettre que :

$$r_X^{net} + r_{S1}^{net} + r_{S2}^{net} + r_{CO_2}^{net} = 0 \quad \text{Équation 83}$$

$$\text{Soit } r_X^{net} = -(r_{S1}^{net} R_{S1,X} + r_{S2}^{net} R_{S2,X}) \quad \text{Équation 84}$$

$$\text{Et donc } QR = \left| \frac{-(r_{S1}^{net} (1 - R_{S1,X}) + r_{S2}^{net} (1 - R_{S2,X}))}{-\frac{1}{\gamma_{O_2}} (r_{S1}^{net} (\gamma_{S1} - \gamma_X \cdot R_{S1,X}) + r_{S2}^{net} (\gamma_{S2} - \gamma_X \cdot R_{S2,X}))} \right| \quad \text{Équation 85}$$

$$QR = \left| \frac{-((1 - R_{S1,X}) + \frac{r_{S2}^{net}}{r_{S1}^{net}} (1 - R_{S2,X}))}{-\frac{1}{\gamma_{O_2}} ((\gamma_{S1} - \gamma_X \cdot R_{S1,X}) + \frac{r_{S2}^{net}}{r_{S1}^{net}} (\gamma_{S2} - \gamma_X \cdot R_{S2,X}))} \right| \quad \text{Équation 86}$$

Ainsi, par interprétation de l'équation 86, si les rendements restent constants, un accroissement du degré de réduction de la biomasse se traduit par une diminution de $\gamma_{S1} - \gamma_X \cdot R_{S1,X}$ et $\gamma_{S2} - \gamma_X \cdot R_{S2,X}$ et donc un accroissement du QR. Dans le cas où le rendement pour le co-substrat diminue, $\gamma_{S2} - \gamma_X \cdot R_{S2,X}$ augmente plus rapidement que $1 - R_{S2,X}$ et donc le coefficient respiratoire diminue ; cette tendance est d'autant plus marquée que la consommation de substrat 2 devient prépondérante par rapport à la consommation du substrat 1.

Ainsi, le coefficient respiratoire est une variable représentative du devenir du carbone consommé : le degré de réduction des substrats consommés et/ou des produits accumulés

influence directement cette grandeur. Les degrés de réduction du carbone du xylose et du glucose, reportés dans le tableau 47, ont des valeurs identiques ; leur consommation impacte faiblement le coefficient respiratoire. Ainsi, le calcul en ligne de QR n'est pas un indicateur pertinent de la co-consommation des substrats xylose et glucose:

Tableau 46: Degré de réduction des substrats carbonés utilisés lors des fermentations mises en œuvre et des TAG, principal produit.

COMPOSE	DEGRE DE REDUCTION DU CARBONE
Biomasse catalytique	4.19
Glucose	4
Glycérol	4.67
Xylose	4
Xylitol	4.4

L'évolution du QR au cours des cultures sur xylose et glucose, reportée sur la Figure 26, permet les observations suivantes :

- jusqu'à 30 heures de culture (phase II), le QR est constant et égal à une valeur 1.05, valeur caractéristique de la croissance comme le reporte J. Cescut (Cescut, 2009).
- A partir de 30 heures de culture (deuxième moitié de la phase II), le QR varie et il atteint 1.15 à 45 heures de culture (ratio de 70%). Durant cette phase II, les analyses n'ont révélé aucune production extracellulaire de coproduits pouvant expliquer cette variation du QR. Pour les ratio 53,70 et 100 % on devrait obtenir un coefficient respiratoire qui redescend vers la valeur unité du fait de la chute des rendements. Ce que l'on peut observer en début de phase 53 %.
- Lors de la phase III sur xylose pur, le QR reste élevé et égal à 1.12. Pendant cette phase, la production de xylitol est observée comme reportée sur la Figure 27 ; par ailleurs la diminution de la concentration en xylitol dans le surnageant indique qu'il est consommé. Cette production suivi de la reconsommation pourrait expliquer les valeurs de QR ; selon l'équation 82., le degré de réduction du carbone du xylitol étant plus élevé que celui des substrats comme reporté dans le Tableau 46.

En confrontant les observations faites sur les phases II et III, et supposant l'existence de transporteurs spécifiques pour l'import/export de xylitol chez *R. glutinis* de manière

similaire à ceux identifiés chez *Aspergillus niger* et *Candida tropicalis* (van de Vondervoort *et al.*, 2006 ; Jeon *et al.*, 2011), on pourrait supposer que lors de la phase II le xylitol est accumulé intracellulairement, ce qui pourrait expliquer les hautes valeurs du QR.

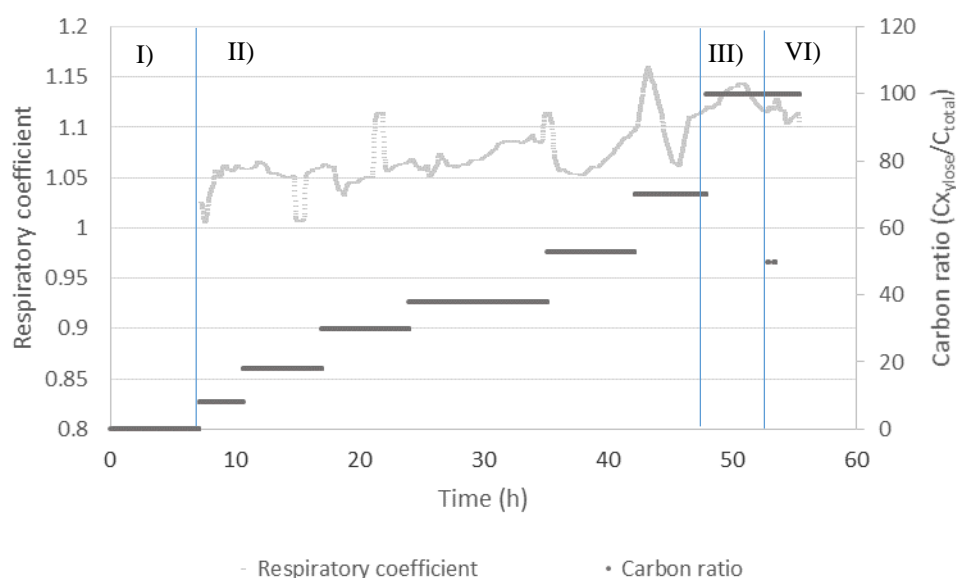


Figure 26: Evolution du coefficient respiratoire au cours du temps lors de la culture de *R. glutinis* en mode fed-batch avec le glucose and xylose comme substrat, sur milieu minéral, à 30 °C, pH 5.5.

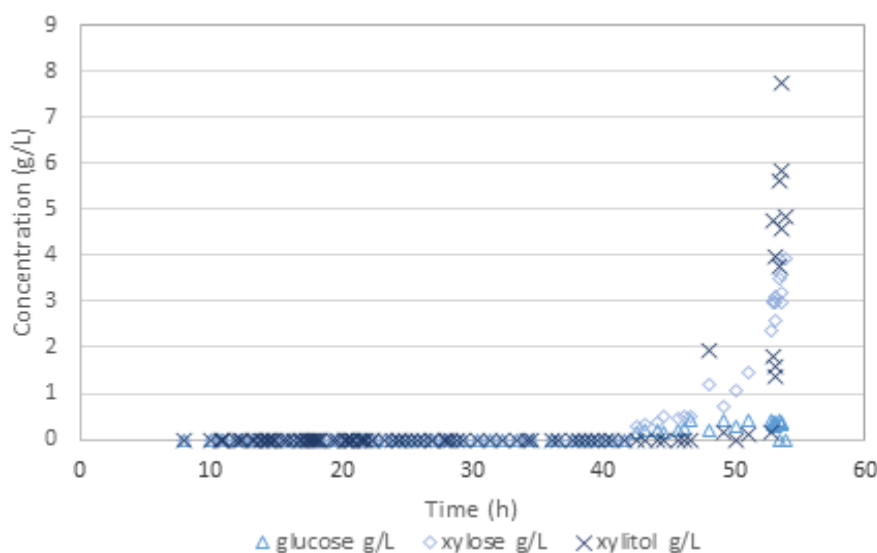


Figure 27 : Concentrations résiduelles en sucres et concentration en xylitol au cours du temps lors de la culture de *R. glutinis* en mode fed-batch avec le glucose et le xylose comme substrat, sur milieu minéral, à 30 °C, pH 5.5.

D'autre part, par similitude avec les travaux de J. Cescut (Cescut, 2009) qui mentionne qu'en conditions d'accumulation lipidique le coefficient respiratoire de la levure oléagineuse

Y. lipolytica est de l'ordre de 1.1, on pourrait émettre l'hypothèse que dans ces conditions de culture *R. glutinis* accumule des substances de réserve. L'hypothèse de l'accumulation lipidique consisterait à supposer que la consommation de xylose entraînerait une augmentation de l'activité de la voie des pentoses phosphate, ce qui pourrait induire un déséquilibre alors à l'origine d'un stress intracellulaire. Or, en réponse à un stress, il est connu que *R. glutinis* accumule des substances de réserves. L'analyse des substances de réserves (lipides et polysaccharides) ont été réalisées ; les résultats sont reportés sur la Figure 28. Les teneurs en polysaccharides et en lipides sont stabilisées autour de respectivement 16% et 21% de la masse sèche. Une composition en polysaccharides en condition de croissance de l'ordre de 6% a été reporté pour la souche d'intérêt (Cescut, 2014) et, toujours d'après la littérature, la composition en lipides en condition de croissance varie entre 5%, 10% et 22.8% de lipides totaux par rapport à la masse sèche (Zhu *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2014). Les valeurs se situent donc dans la fourchette haute de ce qui reporté dans la littérature. Il n'est pas possible d'établir une relation entre les valeurs de QR et la production de lipides ou de polysaccharides.

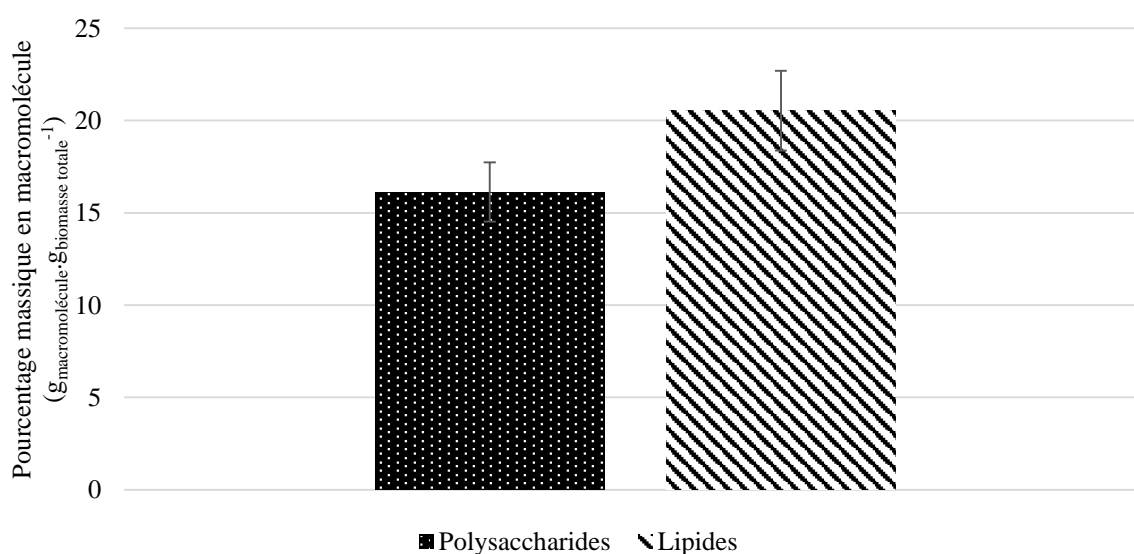


Figure 28 : Teneurs massique en polysaccharides et lipides totaux lors de la culture de *R. glutinis* en mode fed-batch avec le glucose and xylose comme substrat, sur milieu minéral, à 30 °C, pH 5.5.

L'ensemble de ces résultats convergent vers l'hypothèse que la diversification en substrat, et en particulier l'utilisation du xylose comme seule source de carbone ou en co-substrat avec le glucose n'impacte pas la composition macromoléculaire de *R. glutinis*. Le suivi

du coefficient respiratoire indique des variations qui pourraient être expliqués par la production ou la consommation de xylitol.

Conclusion

Ces travaux ont permis de quantifier la croissance de la levure oléagineuse *R. glutinis* (*Rhodospiridium toruloides*) à partir de mélanges binaires - glucose-xylose ou glucose-glycérol- et à partir de constituants purs - glucose, xylose et glycérol -et d'améliorer la connaissance de leur assimilation et de leur devenir. La stratégie des cultures a été déduite de l'étude des flux intracellulaires de carbone : il est apparu que des cultures en mode fed-batch en co-substrats glucose-glycérol et glucose-xylose avec apport de ces mélanges de substrats par paliers successifs sont particulièrement bien adaptées pour les objectifs de l'étude. L'étude théorique stœchiométrique des principales réactions métaboliques de *R. glutinis* a permis de définir les ratios de flux de carbone les débits d'alimentation en substrats pour une quantification rationnelle des cinétiques de croissance de la souche en fonction des sources carbonées apportées. La confrontation des résultats obtenus à partir de xylose et de glycérol permet de dégager similitudes et divergences de comportements lors de l'assimilation de ces deux substrats seuls ou en mélange avec le glucose, elles sont récapitulées dans le Tableau 47.

Tableau 47 : Synthèse des effets de l'utilisation du xylose ou du glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose, sur le métabolisme de la souche *Rhodotorula glutinis*.

Phénomène/ Substrat	Xylose	Glycérol	Glucose (Granger, 1992)
Co-consommation avec le glucose			
- Conditions	- Flux total de carbone limitant	- Flux total de carbone limitant	
- Effet excès de carbone	- Production de xylitol puis accumulation de xylose dans un second temps.	- Accumulation de glycérol	
- Coproduits	- Xylitol, si excès de carbone uniquement	- aucun	
Effet de l'apport progressif			
- Temps de réponse	- Immédiat	- Immédiat	
- Effet sur les cinétiques de croissance	- Diminution du taux de croissance de 0.25 h^{-1} à 0.05 h^{-1} lors de la phase II.	- Diminution du taux de croissance de 0.14 h^{-1} à 0.10 h^{-1} lors de la phase II.	
- Effet sur la vitesse spécifique de consommation du carbone	- q_s décroît dans un premier temps puis se stabilise autour de $0.11 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à partir du ratio 38%.	- q_s décroît dans un premier temps puis se stabilise autour de $0.15 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à partir du ratio 25%.	
- Effet sur les rendements	- Rendement maintenu à $0.6 \text{ C}_{\text{molbiomass}} \cdot \text{C}_{\text{molsubstrat}}^{-1}$ jusqu'au ratio de 38%, puis chute jusqu'à $0.42 \text{ C}_{\text{molbiomass}} \cdot \text{C}_{\text{molsubstrat}}^{-1}$ sur le ratio de 70%	- Rendement maintenu à $0.6 \text{ C}_{\text{molbiomass}} \cdot \text{C}_{\text{molsubstrat}}^{-1}$	
Utilisation en substrats purs			
- Effet sur les cinétiques de croissance	$\mu_{\text{max}} 0.034 \text{ h}^{-1}$	$\mu_{\text{max}} 0.04 \text{ h}^{-1}$	$\mu_{\text{max}} 0.23 \text{ h}^{-1}$
- Effet sur la vitesse spécifique de consommation du carbone	$q_{\text{smax}} 0.12 \text{ C}_{\text{substrate}} \cdot \text{C}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$q_{\text{smax}} 0.13 \text{ C}_{\text{substrate}} \cdot \text{C}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$q_{\text{smax}} 0.40 \text{ C}_{\text{substrate}} \cdot \text{C}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$
- Effet sur les rendements	$Y_{\text{s,x}} 0.28 \text{ C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}$	$Y_{\text{s,x}} 0.31 \text{ C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}$	$Y_{\text{s,x}} .66 \text{ C}_{\text{biomass}} \cdot \text{C}_{\text{substrate}}^{-1}$
- Effet sur les pools macromoléculaires	aucun	-	

La réalisation de ces cultures a permis l'obtention de hautes densités cellulaires révélant tout d'abord la possibilité de la souche à consommer le glucose et le xylose ou le glycérol et le glucose en simples ou co-substrats dans des conditions de croissance. Dans les deux cas, la condition nécessaire de co-consommation est que le flux de carbone total apporté demeure inférieur au flux maximal d'assimilation de la souche. L'apport contrôlé des co-substrats a révélé, dans les deux cas, une diminution des taux de croissance et des vitesses spécifiques de consommation de substrats. Par ailleurs, la flexibilité métabolique de la souche étudiée a été mise en évidence : une très rapide adaptation lors de l'augmentation du ratio en carbone ($\text{Ratio} = C_{\text{cosubstrat}}/C_{\text{total}}$) a été observée pour les deux substrats étudiés. Il a également été démontré qu'un excès de carbone lors de l'utilisation du xylose comme source carbonée en simple ou co-substrat engendre la production de xylitol. La co-consommation, sans production de coproduits, est donc possible, avec le contrôle des flux d'alimentation de chaque substrat à une valeur inférieure ou égale à la vitesse spécifique de consommation du carbone de la souche. La production de xylitol pourrait être causée par un overflow de carbone dans la voie glycolytique et une incapacité de la souche à fournir le NAD^+ nécessaire au catabolisme du xylitol, pour contrebalancer l'excès de NADPH_2 . La régénération de NAD^+ se présente dans ce cas comme un verrou métabolique.

Par ailleurs, l'étude du devenir du carbone à partir de xylose ou de mélange glucose-xylose en condition de croissance n'a pas révélé de changement dans la composition macromoléculaire. Une valeur élevée du coefficient respiratoire a été quantifiée par moment, elle pourrait correspondre à l'accumulation puis à la consommation de xylitol.

Les résultats issus des expériences mises en œuvre permettent d'émettre des hypothèses quant à l'importance des points métaboliques suivants :

- Importance du flux glycolytique pour permettre l'assimilation de glucose avec un co-substrat. On peut supposer qu'il existe plusieurs paliers dans le phénomène observé : (i) un flux glycolytique faible autorisant la co-consommation de glucose et d'autre(s) substrat(s), (ii) un flux glycolytique minimal qui autoriserait la co-consommation de glucose et de xylose avec production de xylitol, mais sans accumulation de xylose, (iii) un flux glycolytique minimal qui autoriserait la co-consommation de glucose et de xylose avec production de xylitol et accumulation de xylose, (iv) enfin on peut supposer l'existence d'un flux minimal à partir duquel aucun autre substrat ne serait consommé.

On suppose en particulier l'importance du rapport des flux glycolyse/PPP dans les phénomènes observés.

- Importance du rapport du flux glycolytique et du flux de la néoglucogenèse (à partir de glycérol) sur les rendements énergétiques et la régénération en cofacteurs.
- La première étape d'assimilation du xylose résulte en sa conversion en xylitol et correspond à la consommation de NADPH₂. Lorsque le flux de glucose est suffisant le cofacteur pourrait être généré par la PPP mais lorsque le ratio $C_{\text{glucose}}/C_{\text{xylose}}$ diminue, il doit probablement trouver son origine ailleurs.
- La production de xylitol peut être due à un flux de génération de NADPH₂ supérieur au potentiel de réoxydation, reflétant un déséquilibre. Toutefois, le potentiel respiratoire mitochondrial observé dans des conditions optimales de croissance sur glucose apparaîtrait suffisant pour assurer ce rôle pour des conditions où la vitesse spécifique de consommation du carbone est très nettement inférieure. La compartimentation cellulaire pourrait-elle être la cause de ces constations ?

D'une manière globale, les résultats obtenus permettent de souligner l'importance de la régénération des cofacteurs, de leur distribution intracellulaire et leur impact sur le rendement énergétique, dont la diminution supposée au fur et à mesure de l'apport progressif en second substrats pourrait expliquer la diminution des cinétiques et des rendements de conversion de substrat en biomasse observés à partir des substrats carbonés xylose et glycérol. Pour ce dernier point, l'importance de la compartimentation cellulaire et en particulier de la mitochondrie semble être primordiale. En effet, la mitochondrie est un organe intracellulaire délimité du cytoplasme par 2 membranes superposées : une membrane externe où la présence de nombreuses porines permet le passage de molécules et une membrane interne repliée recouvrant de nombreuses invaginations membrane dans laquelle se trouve la chaîne respiratoire et où, en aérobiose, a lieu la ré-oxydation des coenzymes réduits. L'entrée du pouvoir réducteur ($2H^+ + 2e^-$) dans la mitochondrie se fait par l'intermédiaire de navettes.

Tout d'abord, la navette citrate-pyruvate fait intervenir l'ATP citrate lyase, la malate déshydrogénase et l'enzyme malique, toutes trois situées dans le cytosol, ainsi que la citrate synthase et la pyruvate carboxylase mitochondriales. Par l'intermédiaire de cette navette, le

malate issu du citrate via le cycle de Krebs est équimolairement utilisé pour la translocation du citrate, qui permet l'export du pouvoir réducteur vers le cytoplasme. Mais ce mécanisme est couteux en énergie (Figure 29).

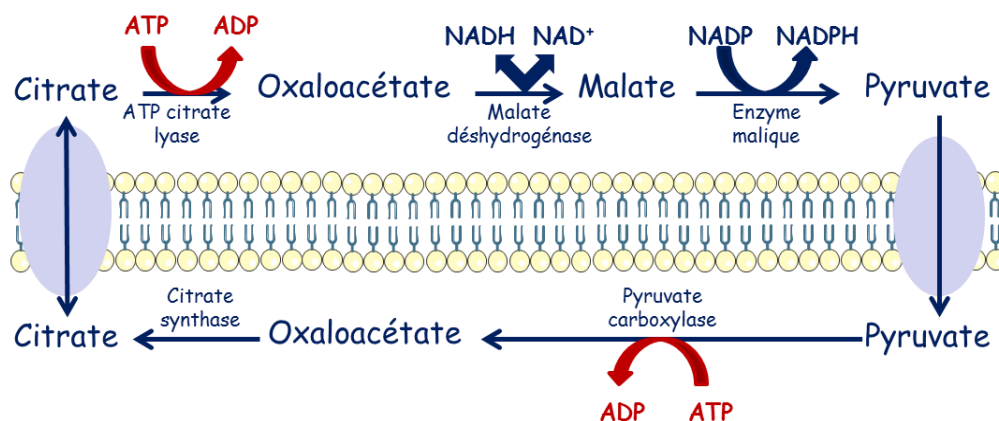


Figure 29 : La navette mitochondriale citrate-pyruvate

L'export du pouvoir réducteur se déroule selon les étapes décrites ci-après. Dans le cytoplasme, la citrate lyase catalyse la scission du citrate en oxaloacétate et en acétate. Ensuite, l'oxaloacétate, est transformé en malate par la malate déshydrogénase de la navette malate/aspartate. Mais ce malate, au lieu d'entrer dans la mitochondrie est utilisé par l'enzyme malique pour produire du pyruvate et du NADPH. Toutefois cette navette qui permet le transfert du pouvoir réducteur du NADH_2 au NADPH_2 équilibre par ailleurs la génération du NADH_2 issu de la synthèse de xylose \rightarrow xylulose. Le pyruvate enfin, rentre dans la mitochondrie où il se transforme en acétyl-CoA (pyruvate déshydrogénase) et en oxaloacétate (pyruvate carboxylase) qui permettent à nouveau la synthèse du citrate. Toutefois le transfert du citrate ce fait en contre transport avec le malate. Ceci suppose une exportation directe du malate mitochondrial (transporteur qui existe) qui va permettre de générer le NADPH_2 sans réoxydation préalable du NADH_2 (comme dans la navette complète). Dans ce cas, on peut expliquer une déficience de la réoxydation du NADH_2 excédentaire en conséquence, une accumulation de xylitol, qui pourrait résulter d'une limitation du potentiel de réoxydation cytosolique. Le coût énergétique de cette voie pourvoyeuse en NADPH, H^+ pourrait expliquer les baisses de rendements lors des forts ratios en xylose.

Par ailleurs, la navette glycérol phosphate met en jeu 2 enzymes : la glycérol 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) cytosolique et un complexe G3PDH situé dans la

membrane mitochondriale (Figure 30). Dans le cytosol, la GPDH convertit le NADH, H^+ en NAD^+ en réduisant la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycérol-3-phosphate, lui transmettant ainsi le pouvoir réducteur. Après être entré dans la mitochondrie via une porine, le glycérol-3-phosphate est reconverti en DHAP par le complexe G3PDH membranaire qui transfère le pouvoir réducteur au FAD pour former $FADH_2$; enfin le pouvoir réducteur est transféré à un élément mobile (Q) qui le transfère à la chaîne de transport d'électrons au niveau du complexe III, les électrons rejoignant ainsi le processus de phosphorylation oxydative (Figure 31).

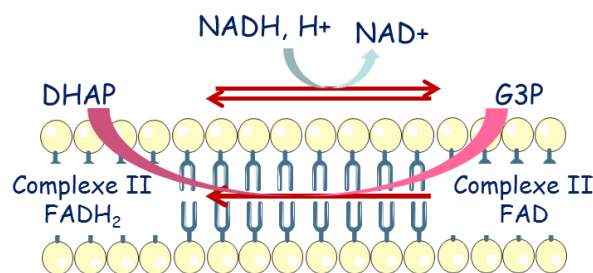


Figure 30 : La navette glycérol-phosphate, entre le cytosol et la membrane mitochondriale.

Avant l'utilisation de la navette glycérol-phosphate, la réoxydation du NAD réduit formé au cours de la glycolyse a permis la synthèse de 2 molécules d'ATP cytosolique. Dans la mitochondrie, une molécule de NADH, va donner 10 électrons intermédiaires, permettant la synthèse de 10/3 ATP (Figure 31). Ainsi, l'intégration de cette navette explique une diminution du rendement énergétique.

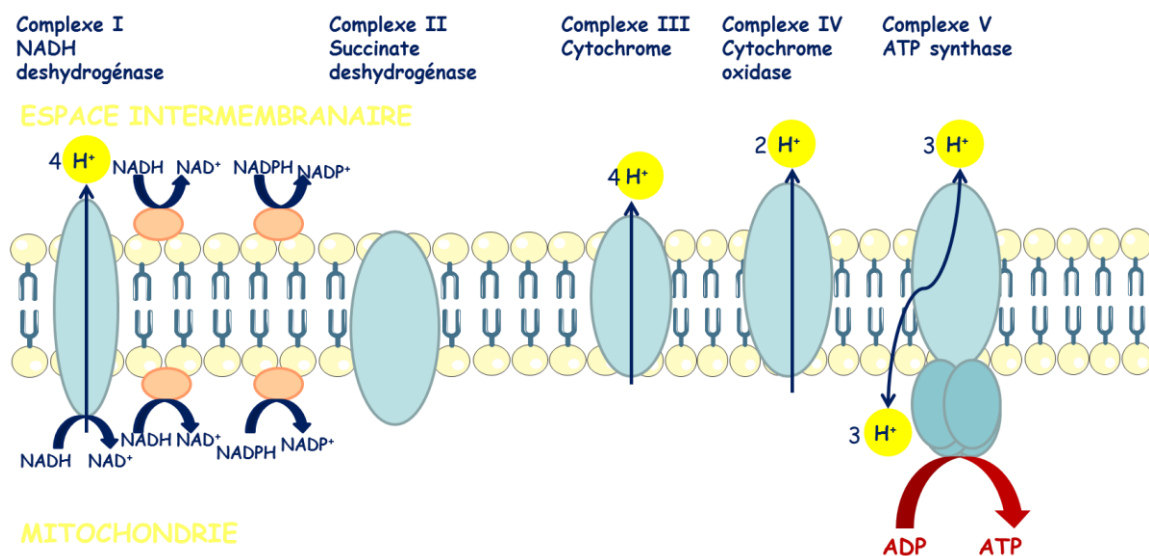


Figure 31: Régénération de pouvoir réducteur et synthèse d'ATP dans la chaîne respiratoire.

La navette malate-aspartate met en jeu la malate déshydrogénase et l'aspartate transaminase sous leurs isoformes cytosolique et mitochondriale (Figure 32). Dans une première étape, dans le cytosol, le NADH transfère ses deux électrons à une molécule d'oxaloacétate sous l'action de la malate déshydrogénase. Le malate franchit ensuite la membrane mitochondriale externe à l'aide d'une porine puis emprunte un antiport malate- α -cétoglutarate pour franchir la membrane mitochondriale interne. Dans la mitochondrie, le malate est oxydé à nouveau en oxaloacétate par une malate déshydrogénase mitochondriale ce qui convertit une molécule de NAD^+ en NADH. L'oxaloacétate est converti en aspartate sous l'action d'une aspartate aminotransférase mitochondriale par transfert d'un groupe amine du glutamate converti en α -cétoglutarate ; l'aspartate emprunte un antiport glutamate-aspartate pour franchir la membrane mitochondriale interne, puis franchit la membrane mitochondriale externe via une porine pour regagner le cytosol ; l'aspartate cytosolique est converti en oxaloacétate par une aspartate aminotransférase cytosolique qui produit également du glutamate à partir de l' α -cétoglutarate. Ce mécanisme de transport passif présente l'avantage de préserver le potentiel de transfert des électrons produits par les oxydations cytosoliques, car ces électrons sont transférés indirectement d'un NADH cytosolique à un NADH mitochondrial.

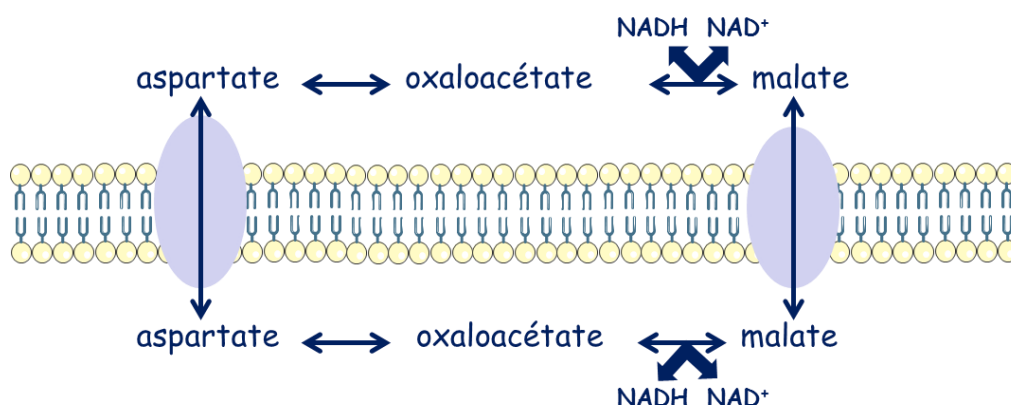


Figure 32 : la navette mitochondriale malate-aspartate

Ainsi, les navettes mitochondriales jouent un rôle fondamental dans la régénération des cofacteurs. La complexité de leur fonctionnement et le couplage de métabolites sur lesquels elles reposent permettrait d'expliquer un équilibre du pouvoir rédox.

Ces travaux argumentent de perspectives intéressantes sur la diversification de substrats carbonés pour la production de lipides. A ce stade des travaux, la problématique qui se pose est alors la suivante : comment gérer les flux d'alimentation N/C en maintenant la consommation de deux substrats carbonés tout en garantissant une croissance résiduelle –

puisque'il a été démontré qu'un renouvellement cellulaire permet d'atteindre des vitesses d'accumulation de lipides optimales (Cescut, 2009)- et favoriser l'accumulation lipidique? Il est aussi intéressant de se demander si la flexibilité métabolique de la souche et si sa capacité d'adaptation vont être maintenus en condition d'accumulation lipidique à partir des substrats d'intérêt considérés dans ce travail. L'importance des co-facteurs a déjà été soulignée lors de la simple ou co-consommation du xylose, l'équilibre redox étant par ailleurs un point clé du métabolisme lipidique, il est légitime de se demander si ce stress intracellulaire va favoriser ou au contraire désavantager l'accumulation lipidique. En complément, quel serait l'impact de la diversification des sources de carbone sur le profil lipidique ?

Chapitre 2 : Répartition du carbone à partir de xylose ou de glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose en condition de limitation azote par la levure Rhodotorula glutinis.

1. Conduite de culture pour l'accumulation de lipides par la souche d'intérêt en co-substrats.

Comme reporté dans le chapitre 1 (Chapitre I : Devenir du carbone en conditions de croissance à partir de xylose et glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose. page 117), *R. glutinis* (*R. toruloides*) est un microorganisme oléagineux qui se distingue par sa capacité à accumuler des quantités importantes de lipides, qui peuvent atteindre jusqu'à $0.70 \text{ g}_{\text{lip}}.\text{gX}^{-1}$. Dans le chapitre précédent, il a été montré que la levure étudiée est capable de consommer du xylose et du glycérol et de les co-consommer en présence de glucose en conditions limitantes de carbone, avec des cinétiques et des rendements inférieurs à ceux reportés dans la littérature à partir de glucose. Dans ce second chapitre, l'étude consiste à caractériser les potentialités d'accumulation lipidique de *R. glutinis* à partir des mêmes substrats carbonés : glucose, xylose et glycérol. La quantification de la physiologie de *R. glutinis* et de son comportement dynamique est réalisée lors de cultures en bioréacteurs, en conditions parfaitement maîtrisées de limitation nutritionnelle par l'azote et en présence de ratios de substrats carbonés (glucose-xylose et glucose-glycérol) variables. L'objectif à terme est de déduire de ces résultats les stratégies d'optimisation du rendement de conversion des substrats en lipides et de la productivité globale de lipides sur les différents substrats considérés.

1.1. Etude expérimentale : le mode de culture

Les cultures en mode fed-batch permettent d'atteindre de hautes densités cellulaires : les concentrations en biomasse avec la souche *Rhodotorula glutinis* peuvent être de l'ordre de 100 gX.L^{-1} (Granger, 1992). Par ailleurs, ce mode de conduite permet de contrôler les apports en substrats carbonés, ce qui, en condition de croissance, comme cela a été mis en évidence dans le précédent chapitre, est fondamental pour l'obtention d'une co-consommation. Ce mode de culture permet également d'induire des changements de métabolisme en introduisant une limitation nutritionnelle pour déclencher l'accumulation lipidique, tout en bénéficiant du vécu microbien antérieur. Le mode fed-batch dans un bioréacteur de 20L parfaitement instrumenté est donc utilisé pour l'ensemble de cette étude sur la répartition intracellulaire du carbone lors

de l'accumulation de substances de réserve en condition de limitation nutritionnelle chez la levure *Rhodotorula glutinis*.

1.2. Limitation nutritionnelle : l'azote et le carbone

La nature et l'intensité de la limitation nutritionnelle sont des paramètres essentiels pour déclencher et contrôler l'accumulation lipidique. En mode fed-batch, la vitesse spécifique de consommation en élément limitant doit être suffisamment élevée pour permettre une croissance résiduelle nécessaire au renouvellement de la biomasse (Cescut, 2009). L'azote est la limitation nutritionnelle la plus répandue dans la littérature. C'est aussi la plus aisée à maîtriser pour induire les phénomènes d'accumulation lipidique puisqu'elle permet de contrôler de manière directe l'évolution de la biomasse catalytique par la maîtrise des cinétique de croissance, ce qui apporte l'avantage d'éviter les dérives quant au devenir du carbone (Granger *et al.*, 1992, Cescut, 2009, Wiebe *et al.*, 2012). La limitation par l'azote est donc la stratégie retenue pour nos expérimentations.

Afin de quantifier les dynamiques du métabolisme de la levure lors de l'accumulation de lipides en condition intensive, la stratégie de culture de la levure oléagineuse d'intérêt comprend deux phases : une phase de croissance exponentielle et une phase d'accumulation sous limitation azote (Cescut, 2009). La première phase permet ainsi de produire la biomasse catalytique (biomasse totale hors lipides accumulés) dans un état physiologique contrôlé et avec une concentration suffisamment élevée pour une exploration rationnelle de la phase d'accumulation. Cette phase de croissance est contrôlée par l'apport de carbone, elle est réalisée à partir de glucose comme source carbonée. Le substrat est apporté de manière à imposer un taux de croissance proche du taux de croissance maximal de la souche. Dans la seconde phase, la limitation en source azotée est initiée par substitution de la solution d'ammoniaque régulatrice du pH par une solution d'hydroxyde de potassium. Lorsque la limitation est effective, son contrôle est effectué par la maîtrise du débit imposé d'une solution d'ammoniaque, qui fixe alors le taux de croissance de la culture.

La croissance résiduelle étant contrôlée par l'apport limitant en azote, le carbone ou les ratios de carbone sont apportés en excès par rapport aux besoins de croissance déterminés par l'apport en azote, pour permettre l'accumulation de substance de réserve. Les ratios de mélange

de substrats carbonés glucose-xylose ou glucose-glycérol sont définis, appliqués et ajusté au cours de chaque fermentation de manière à :

- Eviter l'accumulation de substrat dans le moût de fermentation.
- Permettre la co-consommation lors de l'apport de ratios en substrats
- Eviter la formation de coproduits indésirables (ex. : le xylitol)
- Réduire le N/C apporté de manière progressive selon un profil exponentiel décroissant au cours de la fermentation.

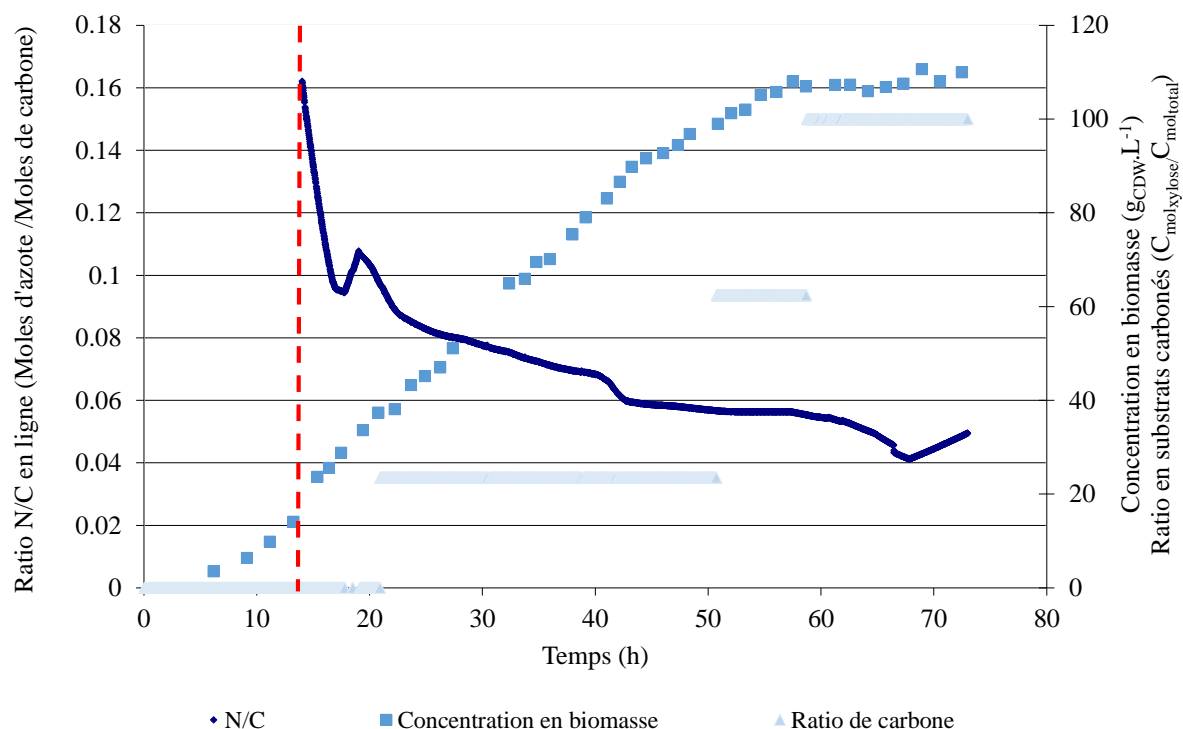
1. Capacité d'accumulation de macromolécules à partir de diverses sources carbonées

1.1. Résultats expérimentaux

1.1.1. A partir de glucose et de xylose en simple ou co-substrats

La Les pointillés indiquent la mise en place de la limitation en azote.

Figure 33 représente l'évolution des principaux paramètres biologiques lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis* en mode fed-batch, à 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose et limitation azote. Après une phase de croissance à partir de glucose comme seule source carbonée, la limitation en azote est mise en place (ce qui est représenté par des pointillés rouges sur la figure). La concentration en biomasse est alors de 15 g_{cdw}.L⁻¹. Le métabolisme de synthèse et d'accumulation lipidique est initié, sous le fait de la limitation nutritionnelle, toujours en utilisant le glucose comme substrat carboné. Une fois le métabolisme de la souche oléagineuse stabilisé, le premier pallier d'alimentation en co-substrats xylose-glucose est mis en place. La concentration en biomasse totale est alors de 37 g_{cdw}.L⁻¹. Deux ratios intermédiaires d'apport en co-substrats (23 et 62%) sont ainsi expérimentés au cours de la fermentation avant que seul le xylose ne soit apporté, après 58 heures de culture. Le ratio N/C apporté est de 0.16 en début de culture; il évolue ensuite au cours de la culture selon un profil exponentiel décroissant en fonction de la capacité de la souche à accumuler des lipides et à consommer les substrats carbonés. Il est en fin de culture proche de 0.04 mol_N.mol_C⁻¹. La concentration en biomasse totale a pour valeur finale 110 g_{cdw}.L⁻¹.

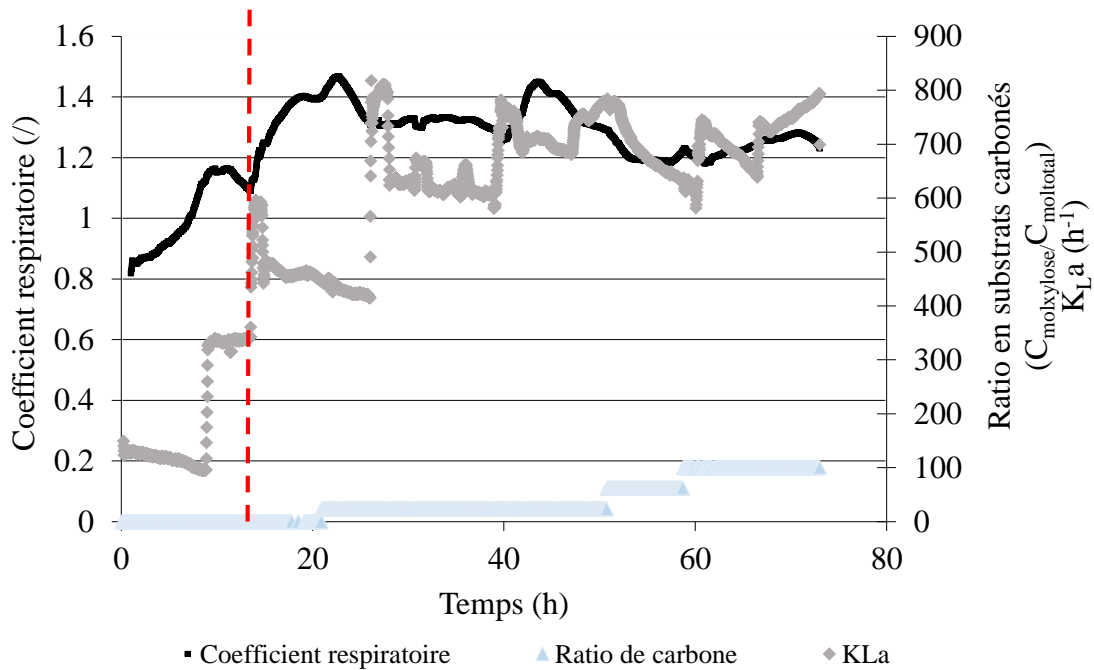


Les pointillés indiquent la mise en place de la limitation en azote.

Figure 33 : Evolution de la concentration en biomasse totale, du ratio azote sur carbone et du ratio de l'apport en substrats carboné lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

Le coefficient respiratoire, défini selon $QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}}$ (Cf. Partie 3 5.3. page 105) est un

indicateur en ligne pertinent caractéristique du métabolisme de la synthèse lipidique : en conditions d'accumulation il tend à augmenter du fait du caractère plus réduit des lipides par rapport au degré de réduction de la biomasse. Son évolution, ainsi que celle du coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène K_{La} (cf. Matériel et Méthodes, page 100) sont représentées sur la Figure 34.



Les pointillés indiquent la mise en place de la limitation en azote.

Figure 34 : Evolution du K_{La} , du coefficient respiratoire et du ratio en substrats lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

L'évolution du coefficient respiratoire ne peut être interprétée que lorsque les conditions de transfert gazeux sont stabilisées. En effet, lors d'un changement des paramètres d'aération (agitation et surtout conditions d'aération), on peut observer une brusque désorption du CO_2 suraccumulé dans le moût de fermentation, qui impacte l'analyse de gaz par un signal non représentatif de l'activité métabolique instantanée. Il apparaît, lors de la phase de croissance, et, après une première augmentation du K_{La} à 9 heures de culture que le coefficient respiratoire se stabilise autour de 1.15. La mise en place de la limitation par l'azote à 14 heures de culture (pointillés rouges sur la Figure 34) s'accompagne immédiatement d'une augmentation du QR, ce qui traduit la mise en place de la biosynthèse lipidique. Un peu avant 20 heures, la stabilisation du coefficient autour de 1.4 (et donc la stabilisation du métabolisme de la souche) a encouragé l'établissement de l'apport en xylose en co-substrat avec le glucose par la mise en place d'un premier ratio. Tout au long de la culture, le coefficient respiratoire demeure élevé par rapport à la valeur de 1.15 observée avant la mise en place de la limitation azote ; il est supérieur à 1.2, ce qui met en évidence le métabolisme de synthèse lipidique et son maintien tout au long de la culture. Cependant, l'augmentation progressive de xylose dans la part du carbone apporté semble correspondre à une diminution relative du coefficient respiratoire : entre 30 et 40 heures de culture, alors que le ratio est de 23%, le QR est stabilisé

à 1.32 ; entre 50 et 60 heures de culture, le QR est stabilisé à 1.2. Cette variation pourrait s'expliquer par les différences de degré de réduction entre substrats (glucose, xylose) et produits (biomasse catalytique, TAG) (Tableau 48). Elle pourrait aussi argumenter d'un ralentissement du mécanisme d'accumulation.

Tableau 48: Degré de réduction des substrats carbonés utilisés lors des fermentations mises en œuvre et des TAG, principal produit de *Rhodotorula glutinis*.

COMPOSE	DEGRE DE REDUCTION DU CARBONE
Biomasse catalytique	4.19
Glucose	4
TAG	5.58
Xylose	4
Xylitol	4.4

La Figure 35 reporte l'évolution des concentrations en sucre et métabolites dans le surnageant de culture. Aucune trace d'acide organique n'a été quantifiée.

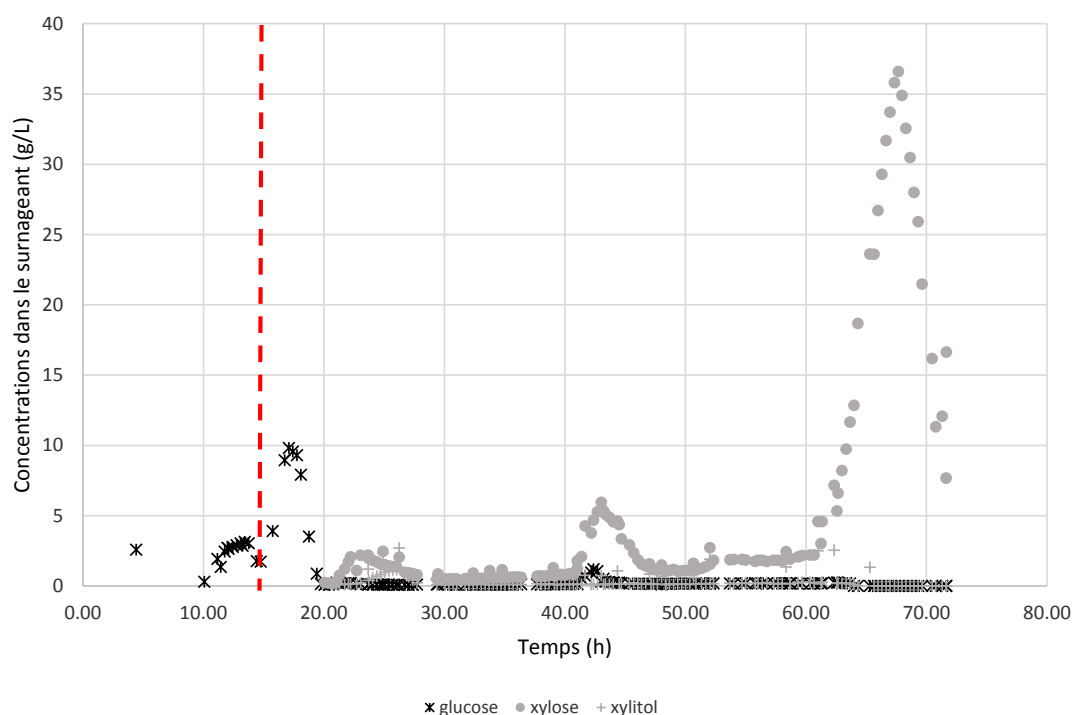


Figure 35 : Concentrations en substrats résiduels et en xylitol dans le surnageant lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

Nous observons que :

- lors de la mise en place de la limitation en azote, du glucose s'accumule à raison de 10g/L puis la concentration résiduelle en glucose est nulle à partir de 20h de culture.
- lors de la mise en place de la co-alimentation à 21h, puis à 40 h, la concentration en xylose atteint respectivement 2 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹; il est consommé tout au long de la culture avec une concentration en xylose inférieure à 0.1 g.L⁻¹ avant le pic de 40 heures, après le pic de 40 heures la concentration résiduelle est inférieure à 1.5 g.L⁻¹.

De plus, lors du dernier ratio, où le xylose est apporté comme seule source de carbone, une très forte accumulation a lieu (environ 35g.L⁻¹ dans le surnageant). Le pentose accumulé sera toutefois reconsommé dans la dernière phase de la culture, après un ajustement du débit d'alimentation : en début de ratio, la vitesse de consommation de xylose était plus faible que le flux de xylose apporté.

La concentration en xylitol est en dessous du seuil limite de quantification excepté autour de 26 h, 44 h, et pendant l'intervalle 58-65 h où les valeurs maximales sont respectivement 2.7 g.L⁻¹, 0.2 g.L⁻¹ et 2.6 g.L⁻¹. Ces pics correspondent à un excès de carbone : dans les trois cas cités le xylose résiduel dans le surnageant est non nul. Lors du dernier ratio, la très faible production de xylitol malgré l'excès de xylose semble indiquer que dans ces conditions le xylose excédant les capacités d'accumulation de la souche n'est ni consommé, ni catabolisé, il est accumulé dans le milieu. Ce résultat s'oppose aux observations faites en condition de croissance (chapitre 1) où en présence d'un excès de carbone (xylose ou glucose) on observe la production de xylitol – indiquant, dans ce cas, que le xylose est consommé mais non catabolisé. Il semblerait, d'après ces résultats, que le comportement de la levure diffère en condition d'accumulation de lipides. Cette divergence peut s'expliquer par le besoin en co-facteurs. En effet, lors du métabolisme d'accumulation lipidique, le pouvoir réducteur fourni par le NADPH, H⁺ est nécessaire pour réduire les groupes acétyl en chaînes acyls d'acides gras (16 moles de NADPH, H⁺ pour un acide gras en C18). Alors que la régénération de pouvoir réducteur est donc déterminante dans la capacité d'accumulation de TAG, elle détermine aussi la capacité de consommation du xylose : la xylose-réductase NADPH-dépendante convertit le D-xylose en xylitol qui via la xylose-déshydrogénase NAD⁺ dépendante est transformé en xylulose. L'utilisation de xylose pour la synthèse lipidique complexifie donc le problème déjà complexe de la régénération de pouvoir réducteur. Dans ces considérations et sur la base des observations expérimentales, le flux de production de NADPH₂ semble limitant : le NADPH₂

nécessaire à la synthèse de xylitol pourrait être préférentiellement mobilisé pour la synthèse lipidique, ce qui expliquerait que même en condition d'excès de carbone le xylitol ne s'accumule pas.

La Figure 36 représente les pourcentages massiques en lipides totaux et polysaccharides totaux accumulés par la levure au cours de la culture. Ces résultats révèlent que l'accumulation lipidique est initiée sur glucose pur (18% de lipides et 8% de polysaccharides après 14h de culture, 22% de lipides et 11% de polysaccharides à 22h de culture), et qu'elle se poursuit lors de la mise en œuvre de la co-alimentation en glucose et xylose. Lors du ratio carbone de 23%, entre 40 et 45 heures de culture, une très haute teneur en macromolécules apparaît: les pourcentages massiques en lipides et polysaccharides atteignent respectivement 50% et 10% de la biomasse totale

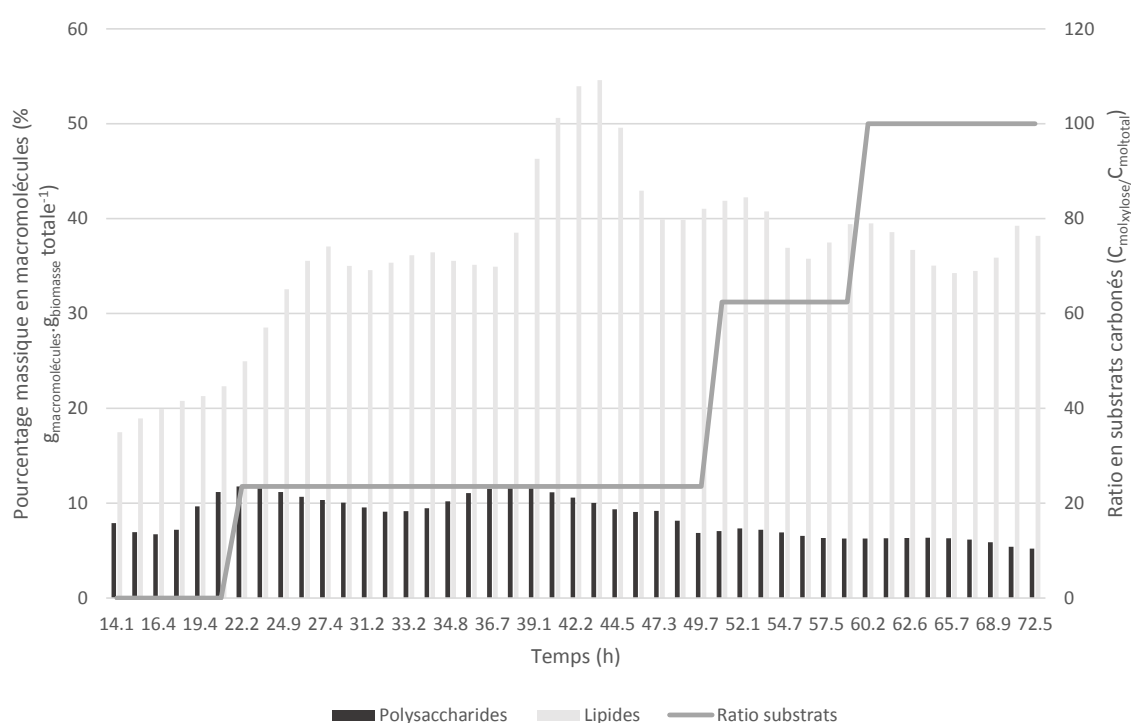


Figure 36 : Evolution des pools macromoléculaires lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

A partir de 47 heures, le pourcentage massique en lipides totaux diminue et se stabilise à 40% ; de façon similaire et concomitante la composition en polysaccharides diminue puis se stabilise à 7% en masse de la biomasse totale. Sur ce même intervalle de temps, l'évolution du coefficient respiratoire (Les pointillés indiquent la mise en place de la limitation en azote.

Figure 34) augmente pour atteindre une valeur maximale vers 42 heures de culture (durée qui correspond aux teneurs en lipides proches de 55%) avant de rediminuer pour se stabiliser à 1.2 sur la dernière phase de la culture, pendant laquelle les pourcentages massiques en lipides sont plus faibles (ils oscillent entre 35 et 40%).

1.1.2. A partir de glucose et de glycérol en simple ou co-substrats

Les dynamiques d'accumulation lipidique de *Rhodotorula glutinis* à partir de de glucose et de glycérol ont été étudiées selon la même démarche d'apport en ratios progressifs et quantifiées lors de cultures en mode fed-batch. La Figure 37 représente l'évolution des paramètres biologiques lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*. Les phases expérimentales sont les suivantes : une phase de croissance pure, d'abord avec le glucose comme substrat, puis, lorsque la biomasse atteint $6\text{g}_{\text{cdw}}.\text{L}^{-1}$, à partir de 5 heures de culture, avec le glycérol en co-substrat avec le glucose selon un ratio à 6%. La stabilisation du QR à une valeur de 1.1 sur ce ratio à 6% entre 10h et 16h de culture indique la stabilisation du métabolisme (Figure 38). La limitation en azote est alors appliquée à 16h (ce qui est représenté par des pointillés rouges sur la Figure 37) alors que le ratio carbone de 6% est maintenu. La concentration en biomasse est alors de l'ordre de $15\text{g}_{\text{cdw}}.\text{L}^{-1}$. En plus de ce premier pallier d'apport en co-substrats, trois ratios intermédiaires (27, 57%, et 78%) sont expérimentés au cours de la fermentation avant que seule l'alimentation de glycérol ne soit maintenue (ratio 100%), après 60 heures de culture. Le ratio N/C apporté évolue au cours de la culture selon un profil exponentiel décroissant en fonction de la capacité de la souche à accumuler des lipides et à consommer les substrats carbonés. En fin de culture il est autour de $0.05\text{mol}_\text{N}.\text{mol}_\text{C}^{-1}$. La concentration en biomasse totale a pour valeur finale $75\text{g}_{\text{cdw}}.\text{L}^{-1}$.

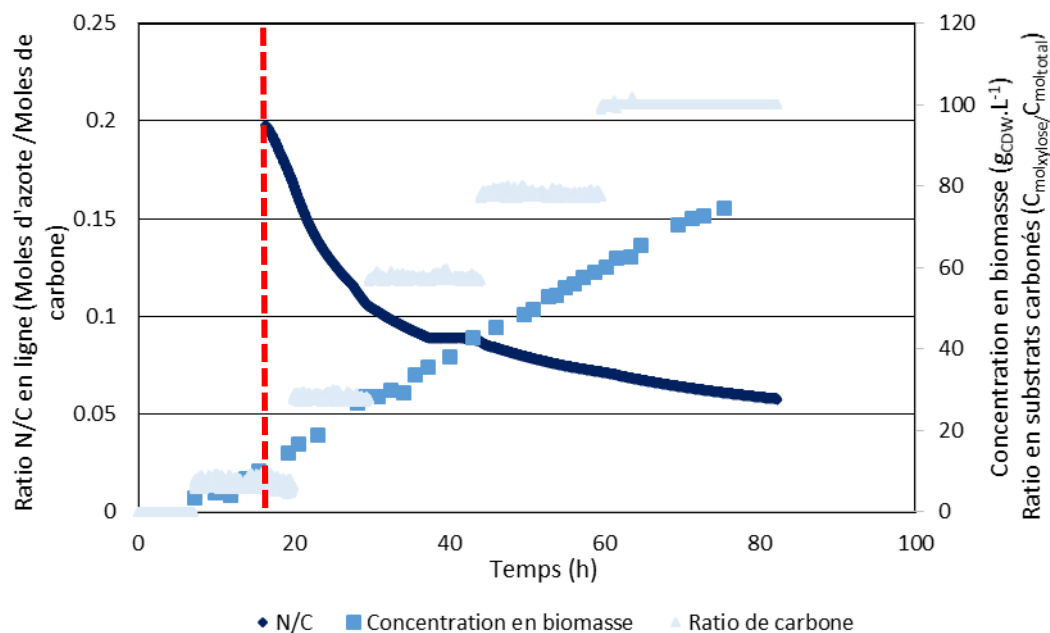


Figure 37 : Evolution de la concentration en biomasse, du ratio azote sur carbone et du ratio de l'apport en substrats carboné lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

L'évolution du coefficient respiratoire, indicateur en ligne de la synthèse lipidique, et du K_{La} sont représentées sur la Figure 38 ; comme mentionné dans le chapitre 1 (Section 1.2 des résultats de la publication, page 133), du fait du caractère plus réduit du glycérol par rapport au glucose, la métabolisation du glycérol entraîne une diminution du QR.

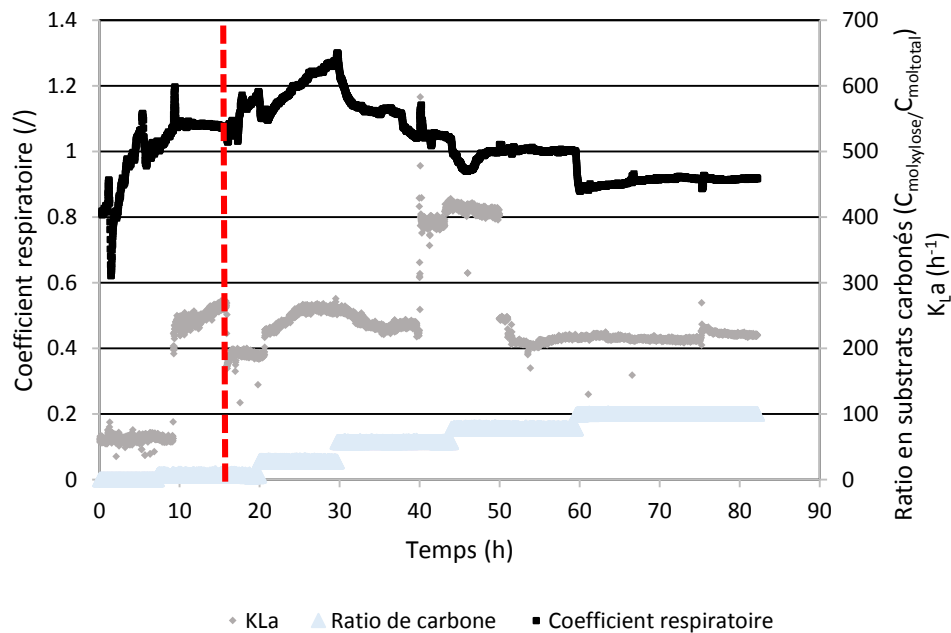


Figure 38 : Evolution du K_La , du coefficient respiratoire et du ratio en substrats lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

Il apparaît, lors de la phase de croissance, que le coefficient respiratoire se stabilise autour de 1.08. Cette stabilisation du métabolisme, indiquant une co-consommation de par la valeur du coefficient respiratoire (pour rappel, le QR était de 1.15 dans l'expérience précédente sur glucose pur avant la mise en place de la limitation) a encouragé la mise en place de la limitation par l'azote (indiquée par des pointillés rouges sur la figure 38). En réponse à la limitation, on observe une augmentation du QR, ce qui traduit la mise en place de la synthèse lipidique. L'augmentation du QR se poursuit lorsque le ratio suivant (27%) est mis en place. Par contre, de manière très nette, le coefficient respiratoire diminue dès lors que l'apport en glycérol augmente : à 20h, 42h et 60h de culture, ce qui correspond respectivement à la mise en place des ratios 57%, 78% et 100%. Les variations de ce signal confortent la (co)-consommation des substrats carbonés. Le coefficient respiratoire stabilisé sur glycérol pur est ici de 0.9. Dans le chapitre 1, le coefficient respiratoire observé sur glycérol pur en condition de croissance était de 0.8. Cette comparaison confirme le maintien du métabolisme d'accumulation puisque le QR est plus élevé qu'en condition de croissance, mais plus faible que celui observé sur les paliers précédents ou sur glucose pur.

Il est intéressant de souligner que dans la perspective d'un suivi en ligne du procédé d'accumulation de lipides, le coefficient respiratoire est un bon indicateur lorsque les substrats carbonés utilisés sont le xylose et/ou le glucose. Cependant la consommation du glycérol entraîne un abaissement du QR, à l'inverse du phénomène d'accumulation de lipides qui induit une augmentation. Ce signal est donc inadapté pour le suivi en ligne de l'accumulation lipidique à partir du substrat glycérol.

La Figure 39 représente les pourcentages massiques en lipides totaux et polysaccharides totaux analysés lors de la culture. Initialement mesurée à 13.5% de la masse sèche totale, la teneur en lipide augmente et semble se stabiliser autour de 35-40% de la biomasse totale. Il est par contre difficile d'évoquer une évolution du pool polysaccharidique : tout au long de l'expérimentation la teneur semble stabilisée entre 8 et 10% de la masse sèche totale.

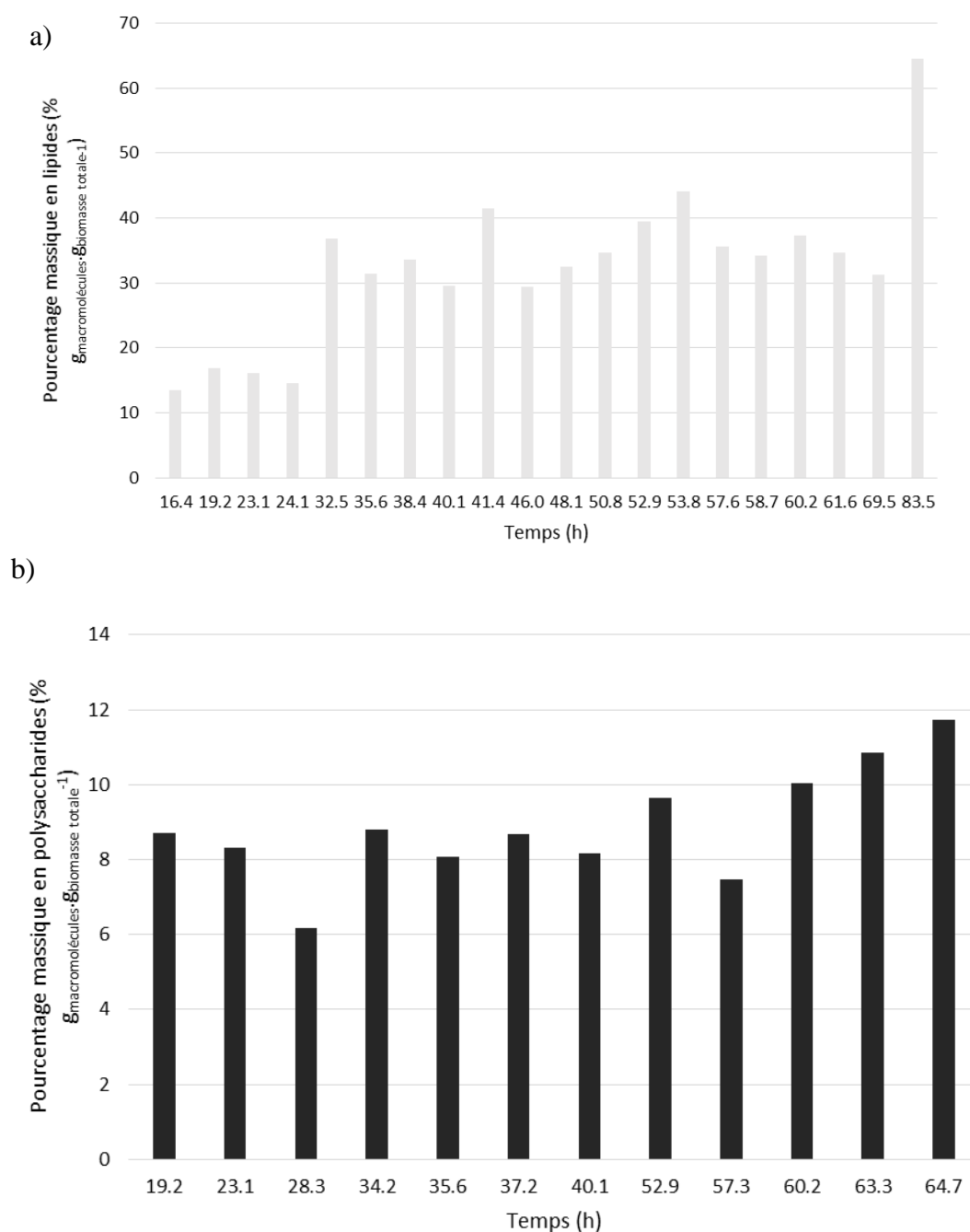


Figure 39 : Evolution des pools macromoléculaires a) lipides intracellulaires totaux b) polysaccharides totaux, lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

Ces résultats montrent que le métabolisme de synthèse et d'accumulation lipidique est mis en place sous le fait de la limitation nutritionnelle par l'azote, alors que glucose et glycérol sont co-consommés. Toutefois, l'évolution des pools macromoléculaire, révélant en particulier une stabilisation assez rapide de la teneur en lipides (Figure 39), ne corrèle pas au N/C apporté

(Figure 37) qui lui diminue continuellement. Une réconciliation des données concernant les compositions élémentaires et macromoléculaire est nécessaire.

1.2.Problématique de la composition de la biomasse catalytique et réconciliation

1.2.1. Définition de la biomasse catalytique.

La biomasse catalytique est définie comme la biomasse métaboliquement active. Sa composition en macromolécules est donc constitutive. En d'autres termes, en condition de croissance pure, la biomasse catalytique correspond à la biomasse totale, tandis qu'en condition d'accumulation de réserves, la biomasse catalytique désigne la biomasse totale dépourvue des substances de réserves accumulées.

La composition élémentaire et la composition macromoléculaire de la biomasse catalytique sont utilisées comme références pour le calcul et l'interprétation des résultats issus des fermentations en condition d'accumulation de substances de réserve, en particulier pour le calcul des vitesses spécifiques.

1.2.2. Problématique

Or, d'après les valeurs présentées ci-dessus (évolution du ratio N/C et pools macromoléculaires), il semblerait qu'il existe une divergence entre la composition élémentaire et la composition macromoléculaire de la souche. Par exemple, dans le cas de la fermentation à partir de glucose et xylose, le pourcentage massique en lipides totaux et polysaccharides totaux est stable à partir de 50 heures de culture (Figure 36) alors que le ratio N/C diminue jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 33). Il en est de même pour la fermentation utilisant glucose et glycérol comme sources carbonées. Comment réconcilier ces données de manière à recalculer les compositions élémentaires et macromoléculaires ? Comment recalculer une composition de la biomasse catalytique de manière à pouvoir réaliser les analyses cinétiques et stoechiométrique ?

1.2.3. Approche de réconciliation

On peut rechercher la composition de la biomasse totale (biomasse catalytique + macromolécules) qui correspond au mieux aux analyses CHON tout en ré-estimant la composition de la biomasse catalytique.

1.2.3.1. Composition de la biomasse catalytique en condition de croissance

La composition élémentaire de la biomasse est déterminée expérimentalement par des analyses élémentaires faites sur des échantillons collectés en condition de croissance sur substrats purs (glucose, xylose et glycérol) purs puis sur des substrats en mélange glucose-xylose ou glucose-glycérol. Les résultats sont présentés dans le Tableau 49.

Tableau 49 : Composition élémentaire de la biomasse catalytique d'après les analyses élémentaires réalisées sur 28 échantillons de fermentation représentatifs de l'ensemble de l'étude.

Elément	C	H	O	N
Composition	1	1.823	0.539	0.161
Ecart-type	-	0.054	0.030	0.014

En supposant que les erreurs sont aléatoires selon une loi normale, 90% des mesures doivent être dans l'intervalle moyenne $\pm 1,63\%$ de l'écart-type. Les données ne correspondant pas à ce critère sont éliminées. Cette étude permet de retenir la composition moyenne présentée dans le Tableau 50.

Tableau 50 : Composition élémentaire de la biomasse catalytique après sélection des données.

Elément	C	H	O	N	P	S	MM _{CHON}	MM _{CHONPS}
Composition	1	1.811	0.534	0.164	0.013	0.001	24.673	25.106
Ecart-type	-	0.051	0.026	0.011	-	-	-	-

Cette composition moléculaire correspond, d'après l'outil de modélisation métabolique développé au sein de l'équipe FAME et décrit dans le matériel et méthodes, à la teneur en macromolécule décrite dans le Tableau 51.

Tableau 51 : Teneur en macromolécules de la biomasse catalytique correspondant à la composition élémentaire présentée dans le Tableau 50, d'après l'outil de modélisation métabolique.

Macromolécules	Pourcentage massique (%)
Protéines	37.1
ADN	10.7
ARN	2
Phospholipides	5.8
Polysaccharides	18.6
Triglycérides	4.6
Stérols	2
Chitine	3.6
Eau	6.6
Cendres	6.92

Les analyses des pools macromoléculaires (lipides et polysaccharides) pour les échantillons en condition de croissance (sans limitation nutritionnelle), sont comparées aux estimations présentées ci-dessus (Tableau 51). La teneur estimée en polysaccharides semble élevée par rapport aux échantillons pour lesquels les substrats utilisés étaient glucose et glycérol (10.15 % +/- 3%) – une hypothèse consiste à admettre que l'on ne dose pas la totalité des polysaccharides, récalcitrants à l'hydrolyse. Par ailleurs, la teneur calculée en polysaccharides elle s'approche très fortement des analyses des échantillons en conditions de croissance sur glucose et xylose en mélange (16 % +/- 1.5%).

Le pourcentage massique de lipides totaux après réconciliation est de 12.4% (stérols, triglycérides, phospholipides). Cette valeur correspond aux pourcentages massiques en lipides totaux analysés en condition de croissance à partir de glucose et de glycérol (13.4%). A partir de glucose et de xylose, la teneur en lipides analysés est plus élevée (21% +/-1.5%).

Ainsi, cette dispersion des analyses en macromolécules issues des analyses ne permet pas de statuer sur une composition macromoléculaire stable et constante de la biomasse catalytique quel que soit le substrat. La variabilité des teneurs en macromolécules de la souche d'intérêt, et plus particulièrement de la teneur constitutive en lipides totaux est également observée dans les travaux antérieurs mentionnés dans la littérature : Zhu *et al.* ont déterminé 22.8% de lipides lors de la culture de *Rhodospiridium toruloides* sur milieu minéral et substrat glucose en culture continue, Zhang *et al.*, ont évalué le pourcentage de lipides à 5% chez *Rhodotorula glutinis* en culture batch substrat glucose en conditions de croissance. Enfin, Yang

et al. reportent que la teneur massique en lipides totaux de *Rhodospiridium toruloides* en fin de phase de croissance est de 10% lors d'une culture sur substrat glucose (Zhu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011 ;Yang *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, les estimations macromoléculaires calculées (Tableau 51) obtenues d'après la composition élémentaire mesurée en condition croissance (Tableau 50) sont pris comme référence pour la suite de l'étude. La problématique qui se pose est la suivante : quelle est la composition élémentaire de la biomasse catalytique correspondant à la composition macromoléculaire retenue ? A partir de cette réconciliation, quels sont les teneurs en macromolécules accumulées ?

1.2.3.2. Calcul de la composition de biomasse catalytique et des pools macromoléculaires en condition d'accumulation de substances de réserves

Les 4 variables suivantes : la biomasse catalytique, les lipides, les polysaccharides et l'eau sont recalculées sur la base de l'accumulation des éléments ou flux élémentaires au cours de la fermentation. Dans les paramètres à considérer pour résoudre le système il est important de noter les points suivants : 1) Comme il a été démontré chez les micro-organismes oléagineux (Cescut, 2009, Portelli, 2012), les polysaccharides sont substrats ou produits en fonction des conditions de culture ; 2) Il est supposé que la teneur résiduelle en eau dans la biomasse sèche est égale à 6,6 % (Tableau 51)

Ainsi, si k éléments sont pris en compte dans la matrice élémentaire (C, H, O et N) on peut calculer k composés de degré de réduction différents, estimés à partir de l'inverse (ou la pseudo inverse) de la matrice élémentaire associée, le système est ensuite résolu selon :

$$\bar{C}_{estimé}^k \cdot V_{(t)} = \left[\int_0^t \bar{\Phi} dt \cdot |E_{mes}| \right] \cdot |E_{est}|^{\#} \quad \text{Équation 87.}$$

Avec $\bar{C}_{estimé}^k$: quantité molaire des variables d'état estimées, $\bar{\Phi}$: flux molaire échangé $|E_{mes}|$ matrice élémentaire des flux mesurés et $|E_{est}|$ matrice élémentaire des variables estimées.

1.3.Résolution : exemple avec le glucose et le xylose comme substrats

La consommation de carbone de la souche cultivée sur glucose et xylose est calculée comme décrit sur l'Équation 88.

$$C^{cons} = C_{gluc}^{ajout} + C_{xyl}^{ajout} - C_{gluc}^{accum} - C_{xyl}^{accum} \quad (\text{Équation 89})$$

A partir du volume théorique calculé (pour s'affranchir des prélèvements et du facteur de dilution due au mode fed-batch), de l'utilisation des données en ligne (masses balances substrats carbonés et azotés), de l'interpolation des substrats résiduels et des coproduits (xylitol), du traitement des gaz ramenés au volume théorique, il est possible de déterminer le flux d'accumulation net en éléments au cours du temps par le produit du vecteur molaire $C^{cons}, O_2, CO_2, NH_3, C_{xylitol}$ par la matrice élémentaire E_{mes} (Tableau 52). Les résultats sont présentés sur la Figure 40.

Tableau 52 : Vecteur molaire utilisé pour le calcul de l'accumulation des éléments E_{mes}

C	H	O	N	
1	2	1	0	Glucose/Xylose
0	0	2	0	O2
1	0	2	0	CO2
0	3	0	1	NH3
1	2.4	1	0	Xylitol

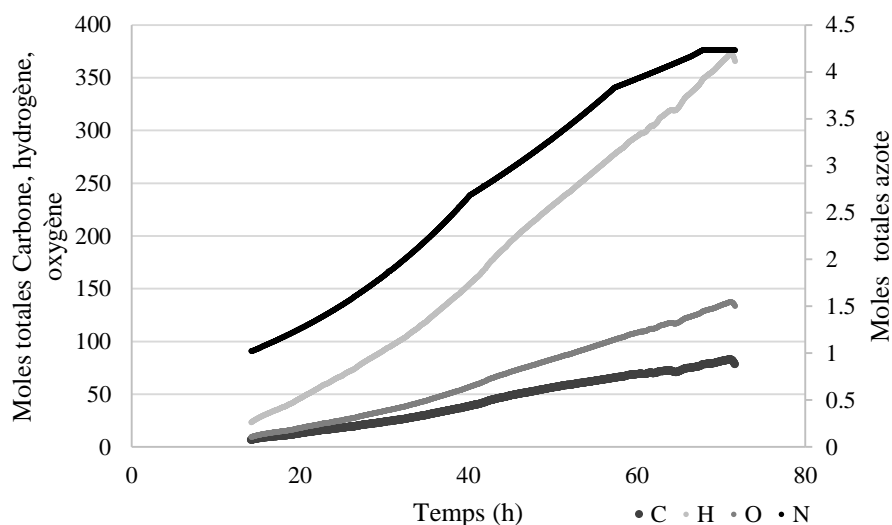


Figure 40 : Accumulation totale des éléments carbone, oxygène, hydrogène et azote au cours d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

On décompose la biomasse catalytique issue de la phase de croissance en 3 éléments

- La biomasse catalytique hors polysaccharides (X_C^*)
- les polysaccharides (Pls)
- les lipides (Lip).

De manière à calculer les pools macromoléculaires accumulés et non constitutifs, le calcul est réinitialisé dès que l'accumulation de substance de réserve est initiée. Les résultats d'accumulation élémentaires sont présentés Figure 41.

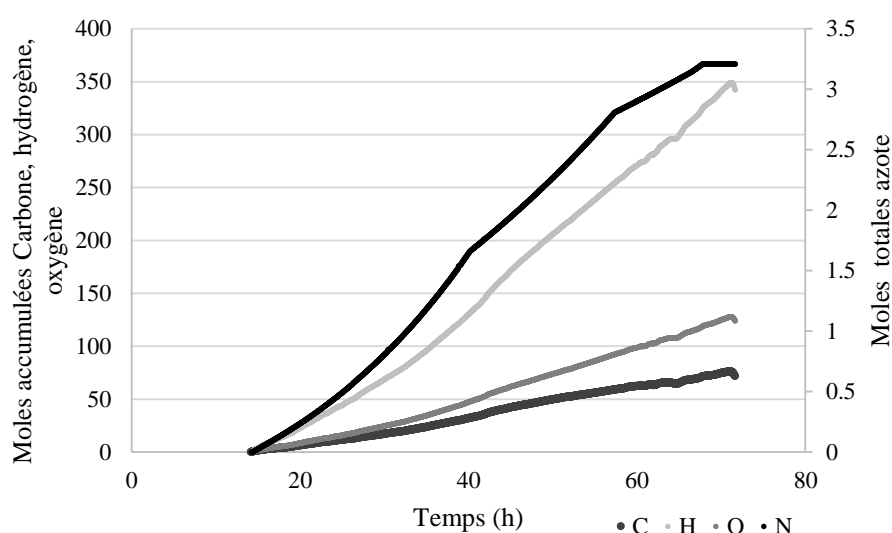


Figure 41 : Evolution des pools macromoléculaires hors biomasse catalytique durant la phase d'accumulation de réserves lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

La composition moyenne en triglycérides utilisée pour les calculs est détaillée dans le Tableau 53 (Cescut, 2009) ce qui correspond à la composition moyenne décrite dans le Tableau 54.

Tableau 53 : Composition des triglycérides accumulés par *Rhodotorula glutinis* (Cescut, 2009)

		C	H	O
--	--	---	---	---

C18	12.7%	18	36	2
C18:1	37.4%	18	34	2
C18:2	14.6%	18	32	2
C18 :3	4.2%	18	30	2
C16	27.7%	16	32	2
C16:1	3.3%	16	30	2

Tableau 54 : Moyenne de la composition des TAG accumulés par *Rhodotorula glutinis*.

C	H	O	Masse Mol.
1.000	1.838	0.109	15.579

La matrice élémentaire $|E_{est}|$ considérée pour l'estimation des variables est détaillée dans le Tableau 55.

Tableau 55 : Matrice élémentaire prise pour l'estimation des variables.

C	H	O	N		MMolaire
1	1.6666	0.8333	0	Pls	27.0
1	a	b	c	X_{cat}^*	MM. X_{cat}^*
1	1.8376	0.1088	0	Lip	15.579
0	2	1	0	H2O	18.0

La composition de X_C^* est donnée variable et la masse molaire est calculée en prenant en compte le phosphore, le soufre et la teneur en cendres tels qu'estimés pour la biomasse catalytique (paragraphe 1.2.3.1 page 169). Ainsi, les valeurs de a,b,c sont initialisées aux valeurs de la biomasse X_C^* , auxquelles correspond la matrice inverse $|E_{est}|^{\#}$ (Tableau 56).

Tableau 56 : Matrice élémentaire inverse prise pour l'estimation des variables.

	Pls	Xcat*	Lip	H2O
C	1.0000	0.0000	0.0000	-0.8333
H	-0.6173	0.0000	0.6173	0.4472
O	1.2346	0.0000	-1.2346	0.1055
N	-2.2460	5.0339	-2.7879	0.4027

A partir du volume théorique l'évolution des concentrations (Pls, Xcat* et Lip) est calculée. Pour Pls et Xcat*, sont rajoutés les concentrations relatives à la biomasse avant limitation et la concentration en biomasse totale est obtenu par la sommation des trois concentrations majorée par une teneur en eau identique à celle précédemment estimée. Le volume est ensuite corrigé en fonction de l'évolution de la concentration en biomasse : lors de cultures à hautes densités cellulaires le volume liquide est nettement inférieur au volume total du fermenteur (effet de concentration).

Enfin, de manière à réajuster la composition élémentaire de la biomasse, on calcule une fonction erreur sommant les écarts entre valeurs estimées par le calcul des quantités et les valeurs expérimentales pour la concentration en biomasse totale selon l'équation 90.

$$f = \sum_{i=1}^n (\hat{C}_{Pls} + \hat{C}_{Lip} + \hat{C}_{Xcat^*} - C_{total}^{mes})^2 \text{ Équation 90.}$$

On ajuste ensuite les valeurs des coefficients a, b et c de manière à minimiser cette fonction erreur. La composition de la biomasse catalytique obtenue est récapitulée dans le Tableau 57.

Tableau 57 : Composition de la biomasse catalytique issue du calcul de réconciliation.

C	H	O	N	Masse Molaire (Cmol.g ⁻¹)
1.00	1.5204	0.4393	0.1281	24.5988

La faible teneur en azote suppose que l'on ait une synthèse de macromolécules de nature osidique autres que les polysaccharides dosés (polysaccharides pariétaux récalcitrants, Chitine).

Ainsi, cette approche de réconciliation aboutit à des résultats qui montrent une adéquation entre les évolutions des quantités de variables d'état estimés et les mesures (Figure 42), ce qui permet de valider la démarche et donc de retenir une composition de la biomasse catalytique en phase de limitation azote légèrement différente de celle obtenue en phase exponentielle de croissance hors limitation.

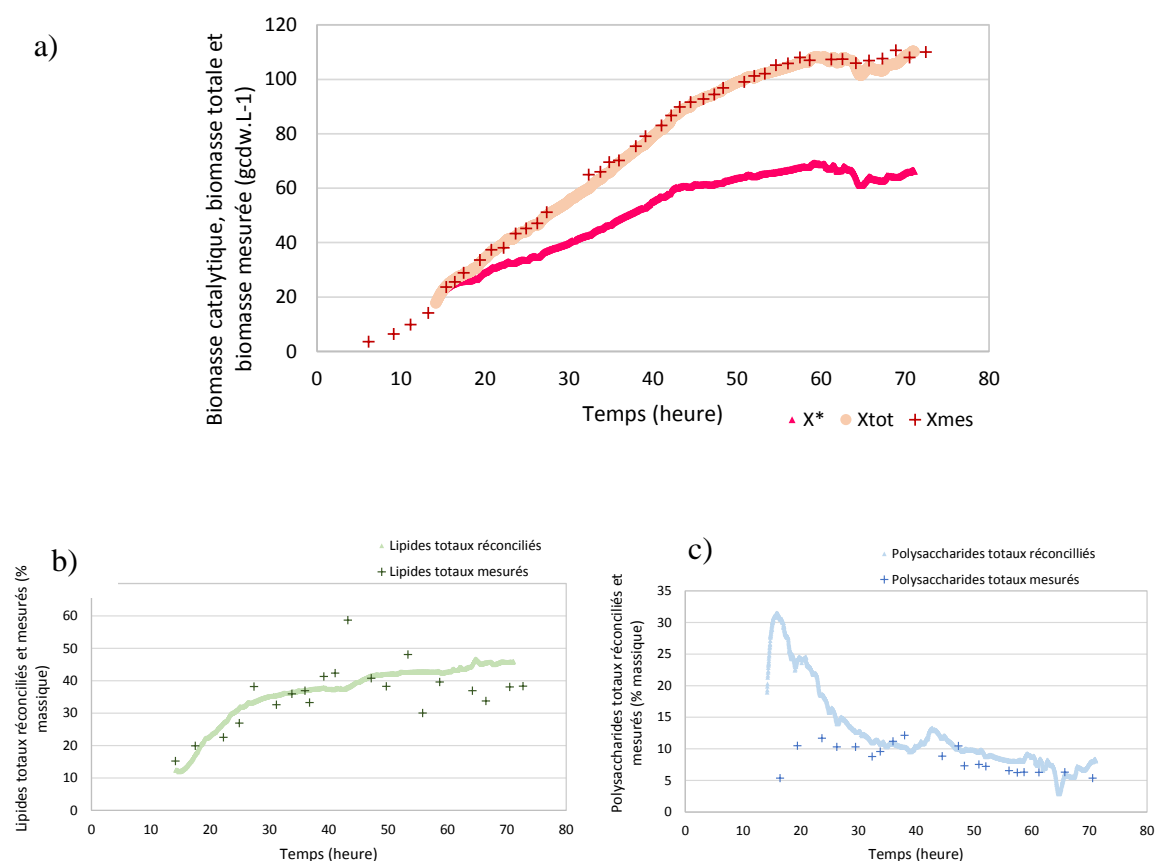


Figure 42 : Résultats de la réconciliation a) de la biomasse, b) des lipides totaux, c) des polysaccharides lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

1.3.1.1. Réconciliation : résultat avec le glucose et le glycérol comme substrats

De la même manière que précédemment décrit les données issues de la culture de *Rhodotorula glutinis* en limitation azote à partir de glucose et de glycérol comme substrats carbonés ont été réconciliées. La composition de la biomasse catalytique calculée est : $CH_{1.8178}O_{0.5372}N_{0.1657}$ qui correspond à la biomasse et aux pools macromoléculaires présentés Figure 43.

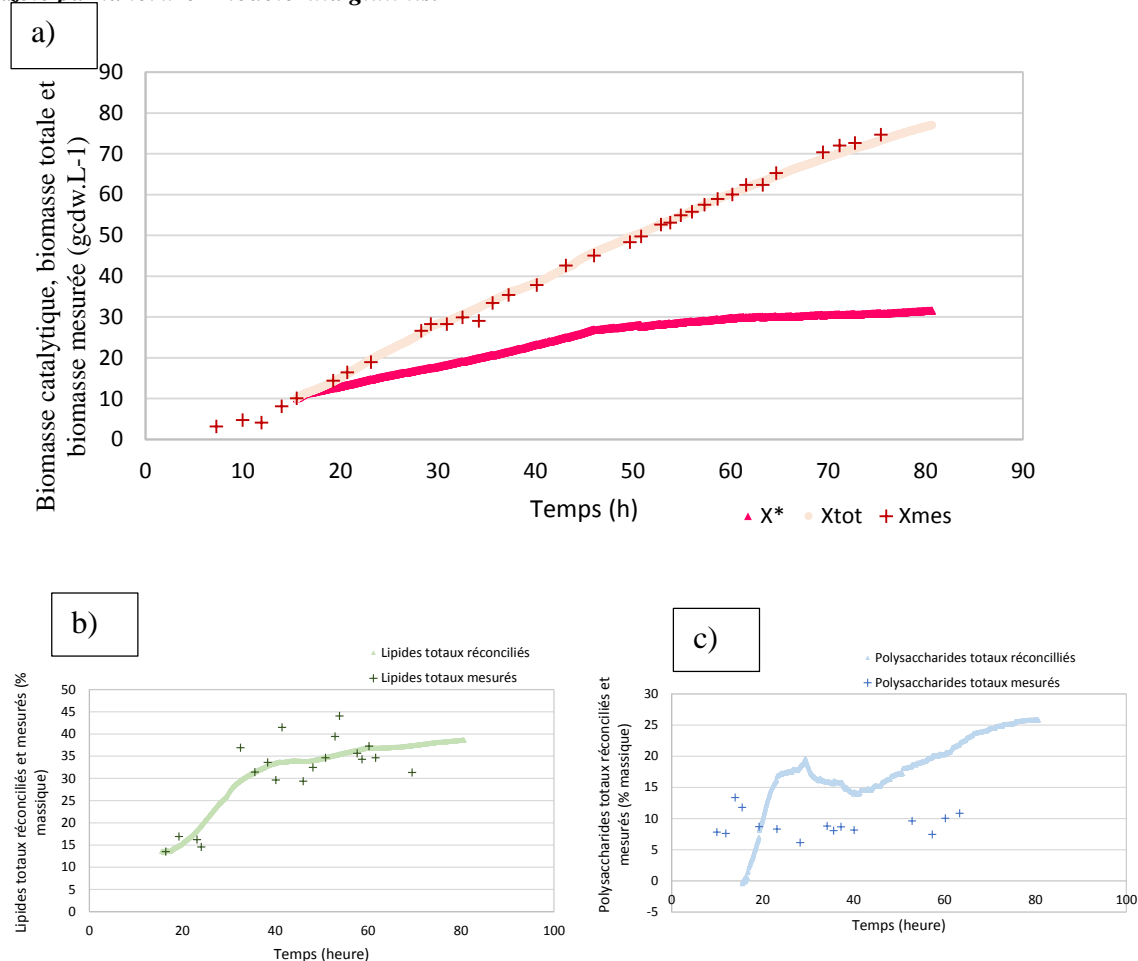


Figure 43 : Résultats de la réconciliation a) de la biomasse, b) des lipides totaux et des polysaccharides lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

Ces valeurs réconciliées sont considérées pour le reste de l'étude : calculs cinétiques et stoechiométriques.

2. Analyses cinétiques

Au cours de la fermentation, les apports en substrats sont contrôlés de manière, d'une part, à maintenir une concentration résiduelle en substrat proche de zéro, mais aussi de s'approcher au plus près des vitesses spécifiques de consommation de carbone maximales de la souche. Vers 40 heures, le flux d'apport en substrat carboné était supérieur au flux de consommation de la souche ; le réajustement des débits des pompes d'alimentation a permis la consommation du carbone accumulé réduisant ainsi la concentration résiduelle (Figure 35 page 160). Sur le ratio où seul le xylose est apporté, il est en excès dans le milieu ; dans ces conditions la valeur de la vitesse spécifique calculée est maximale. Sur la Figure 44 sont

représentées les vitesses spécifiques de consommation du xylose et du glucose en fonction du ratio en substrat. Sur glucose pur, la vitesse spécifique de consommation du carbone est de $0.35 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, elle diminue à $0.22 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ lors du premier ratio de 20%, puis à $0.14 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ lors du second ratio de 60% en enfin elle est égale à $0.11 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ sur xylose pur. Il a été montré dans le chapitre 1 que la vitesse spécifique de consommation de carbone diminue au fur et à mesure de l'apport progressif en xylose et en glycérol. De manière similaire, ce phénomène est observé lors de la mise en place d'une alimentation par apport en ratios successifs de glucose et de xylose, allant de 100% de glucose à 100% de xylose, avec deux ratios intermédiaires de 20% et 60% de xylose par rapport au carbone total apporté, le tout sous la contrainte d'une limitation en azote.

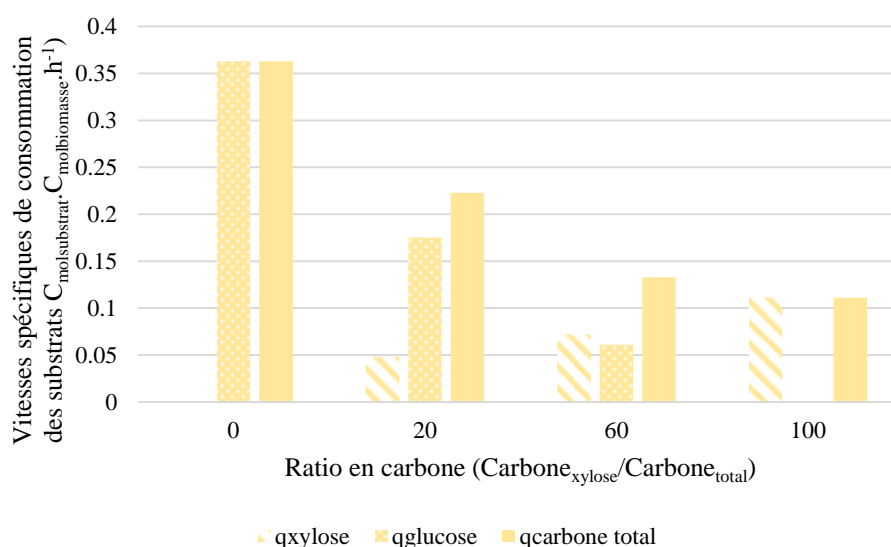


Figure 44 : Vitesses spécifiques de consommation des substrats lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

L'utilisation de xylose en simple ou co-substrat pour la production de lipides par fermentation de la levure *R. glutinis* met donc une contrainte cinétique liée aux seules capacités de consommation du pentose par la souche : il a été montré dans le premier chapitre de ce travail que la vitesse spécifique de consommation du xylose est trois fois inférieure à celle obtenue sur glucose.

La Figure 45 présente les vitesses spécifiques de consommation des substrats lors d'une culture de *R. glutinis*, en mode fed-batch, sur substrats glucose et glycérol et sous limitation azote. On observe une nette diminution entre la vitesse spécifique de consommation du glucose

pur ($0.35 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, cf. Figure 44), et la vitesse spécifique de consommation de carbone dès que le glycérol est introduit. Cependant, pour les deux premiers ratios, 10% et 30%, cette vitesse est stabilisée autour de $0.2 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$. Elle diminue ensuite progressivement quand le ratio augmente. Sur glycérol pur, la vitesse spécifique de consommation du carbone est de $0.11 \text{ C}_{\text{molsubstrat}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$. Elle est donc très proche de celle mesurée sur xylose.

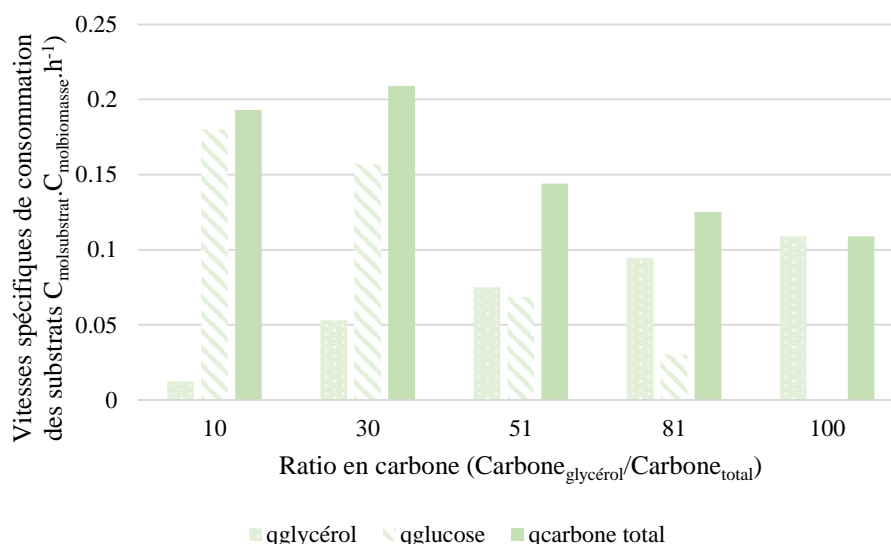


Figure 45 : Vitesses spécifiques de consommation des substrats lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

A partir de glucose pur, il a été reporté dans la littérature que *R. glutinis* peut accumuler davantage de lipides que dans les conditions étudiées : la teneur finale peut atteindre 72% de la masse sèche (Granger, 1992 ; Cescut, 2009). Dans le cadre de notre étude, la teneur finale massique en lipide totaux est de respectivement 45% sur glucose-xylose et 38% sur glucose-glycérol. On pourrait penser que la diminution de la vitesse spécifique de consommation des substrats xylose ou glycérol, en simple ou co- substrat pourrait traduire une diminution du potentiel d'utilisation de ces substrats pour la synthèse de lipides.

Les Figure 46 et Figure 47 représentent les taux de croissance et vitesses spécifiques de production de TAG lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, respectivement sur substrats glucose-xylose et glucose-glycérol en limitation azote. Pour les deux substrats étudiés, l'évolution du taux de croissance spécifique diminue selon le ratio. Ceci peut s'expliquer par l'apport croissant en respectivement pentose ou

glycérol. Il a été ainsi démontré dans la première partie de ce travail que le taux de croissance spécifique maximum sur xylose est de 0.033h^{-1} soit 8 fois inférieur à celui observé sur glucose.

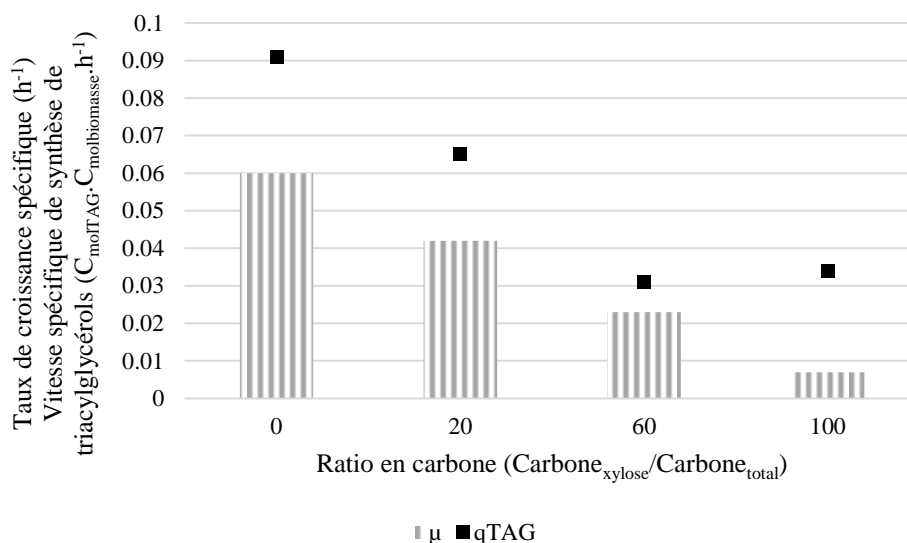


Figure 46 : Taux de croissance et vitesses spécifiques de production de TAG lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

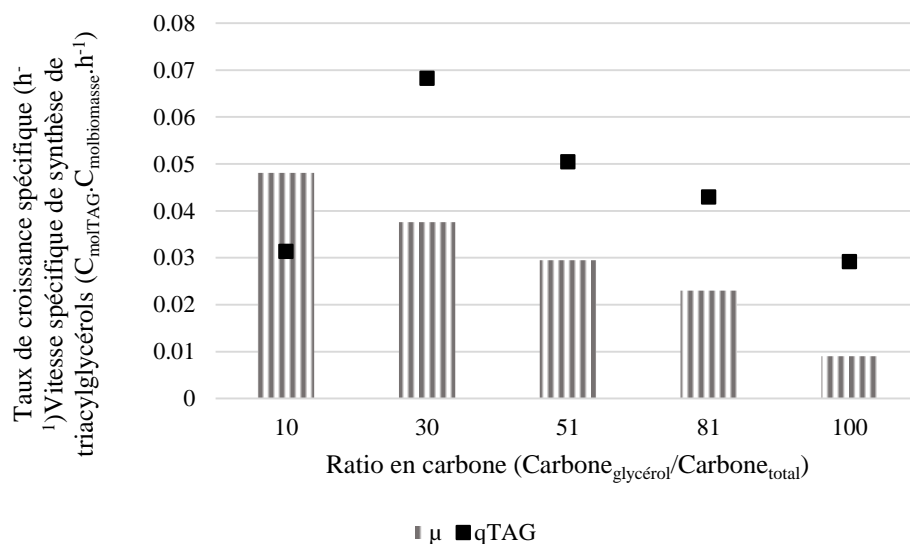


Figure 47 : Taux de croissance et vitesses spécifiques de production de TAG lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

Par ailleurs, la vitesse spécifique d'accumulation lipidique est maximale en début d'expérimentation où elle est de $0.09 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, elle chute ensuite à $0.065 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ lors du ratio de 20% se stabilise ensuite pour les deux derniers ratios (60% et 100%) autour de $0.030 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figure 46). Au fur et à mesure de l'expérimentation, et du ratio croissant en xylose, la vitesse spécifique d'accumulation lipidique décroît. Ainsi, la capacité d'accumulation lipidique diminue mais se poursuit tout au long de l'expérience, mettant en évidence la possibilité de la souche oléagineuse à accumuler des lipides à partir de mélanges glucose-xylose et à partir de xylose pur. Il a été démontré dans la première partie de cette étude la diminution des vitesses spécifique de consommation du carbone au fur et à mesure de l'apport croissant en xylose ou en glycérol. En condition d'accumulation lipidique, cette observation se retrouve et se transcrit par ailleurs par une diminution de la vitesse spécifique d'accumulation lipidique. Ainsi, on peut supposer que ce serait une diminution des potentialités d'assimilation du xylose ou du glycérol qui pourrait induire une perte de potentialité de synthèse de lipide.

La vitesse spécifique d'accumulation lipidique pour des ratios croissants en glycérol est représentée sur la Figure 37. Sur le ratio 10%, la vitesse spécifique d'accumulation lipidique est de $0.03 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$. Sur le deuxième ratio la vitesse spécifique d'accumulation lipidique est de $0.07 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, elle diminue ensuite au fur et à mesure de l'apport croissant en glycérol : elle est de $0.03 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ sur glycérol pur. Ainsi, la vitesse spécifique d'accumulation lipidique n'est pas maximale sur le premier ratio, on peut supposer que sur ce ratio le métabolisme de synthèse de TAG n'est pas encore installé, ce qui expliquerait cette faible valeur. Par contre, lors du deuxième ratio (30%), la vitesse spécifique d'accumulation lipidique est maximale : $0.07 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$; elle est par ailleurs très proche de la valeur maximale de $0.09 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$ observée sur glucose (Figure 46). Ces valeurs sont du même ordre de grandeurs que ceux de la littérature, pour *Rh glutinis* cultivée également en mode fed-batch en condition de limitation azote à partir de glucose pur : les travaux de J. Cescut reportent ainsi une vitesse spécifique d'accumulation de $0.078 \text{ C}_{\text{molTAG}} \cdot \text{C}_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$.

3. Analyse stœchiométrique

Les rendements expérimentaux de conversion du carbone en biomasse et de conversion du carbone en lipides obtenus lors de la culture de *Rh. glutinis* à partir de substrats glucose et

xylose sont récapitulés dans le Tableau 58. Il apparait que le rendement de conversion du carbone en biomasse chute de $0.19 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ à $0.07 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ lorsque le ratio varie de 23% à 100%. Le rendement de conversion du carbone en lipides est constant, indépendamment du ratio de carbone, et égal à $0.3 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$. De manière similaire à ce qui a été observé dans le chapitre 1, en conditions de croissance, l'augmentation du ratio en substrat et donc l'augmentation de l'apport en xylose se traduit par une baisse du rendement de conversion du carbone en biomasse tandis que le rendement de conversion du carbone en lipides se maintient.

Le rendement de conversion du carbone en lipides sur glycérol pur correspond à 50% du rendement théorique limite. De plus, il est inférieur aux valeurs reportées dans la littérature qui sont de $0.42 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ (Cescut, 2009) et de $0.45 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ (Granger, 1992) pour la même souche cultivée sur glucose pur en mode fed-batch.

Tableau 58 : Rendements carbone lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et xylose, limitation azote.

Rendements/Ratios	23%	62%	100%
Rs,x* C_{molbiomasse}.C_{molesubs}⁻¹	0.19	0.18	0.07
Rs,P C_{molelip}.C_{molesubs}⁻¹	0.30	0.24	0.31

..

Les rendements expérimentaux de conversion du carbone en biomasse et de conversion du carbone en lipides obtenus lors de la culture de *Rh. glutinis* à partir de substrats glucose et glycérol sont récapitulés dans le tableau 60. Le rendement de conversion du carbone en biomasse diminue de $0.33 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ pour un ratio à 7% à $0.13 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ pour un ratio à 100% (glycerol pur). Le rendement de conversion du carbone en lipides est très faible sur le premier ratio de 7% ($0.12 C_{molelip}.C_{molesubs}^{-1}$) probablement car le métabolisme d'accumulation n'est pas totalement mis en place. Il atteint ensuite $0.25 C_{molelip}.C_{molesubs}^{-1}$ puis le stabilise autour de $0.30 C_{mole}.C_{mole}^{-1}$ jusqu'à la fin de l'expérimentation ; ce comportement est similaire à celui obtenu pour le xylose pur. La souche présente des performances équivalentes en termes de rendement sur les deux substrats étudiés : le xylose et le glycérol.

Tableau 59 : Rendements carbone lors d'une culture de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, substrats glucose et glycérol, limitation azote.

Rendements/Ratios	7%	25%	53%	64%	100%
$R_{S,X}$ $C_{molbiomasse} \cdot C_{molesubs}^{-1}$	0.33	0.21	0.27	0.25	0.13
$R_{S,P}$ $C_{molelip} \cdot C_{molesubs}^{-1}$	0.12	0.25	0.28	0.28	0.29

4. Effet de la diversification en substrats sur le profil en acides gras

Le profil lipidique en acide gras correspond à la composition en acide gras, après hydrolyse par dérivatisation de l'ensemble des pools lipidiques. Le profil lipidique de *Rh. glutinis* lors d'une culture en condition d'accumulation lipidique et à partir de glucose comme source carbonée est connu pour être centré en acide oléique (C18:1) et très proche de celui de l'huile d'olive (Ratledge 2002, Cescut 2009, site de l'ANSEES).

Le profil lipidique a été déterminé à partir d'échantillons de cultures sur les différents substrats purs et en mélange afin d'évaluer l'impact de la source carbonée sur la nature des acides gras accumulés. Les résultats sont présentés sur la Figure 48.

L'acide oléique (C18:1) est l'acide gras majoritaire puis dans l'ordre décroissant, les acides gras sont l'acide palmitique (C16:0), les acides stéarique et linoléique (C18:0 et C18:2) sont minoritaires, enfin, la composition en acides palmitoléique et linoléique (C16:1 et C18:3) est inférieure à 5%. Une analyse détaillée permet de noter une modulation du profil en fonction de la nature des substrats :

- l'utilisation de xylose entraîne un enrichissement de la composition en acide palmitique et en acide linoléique. Cette tendance apparaît dès l'utilisation de xylose en mélange avec le glucose et est cohérente avec les résultats antérieurs de Wiebe et *al.*, (2012).
- le glycérol semble favoriser l'accumulation d'acide stéarique ce qui est également en adéquation avec les données de la bibliographie (Saenge et *al.*, 2010).

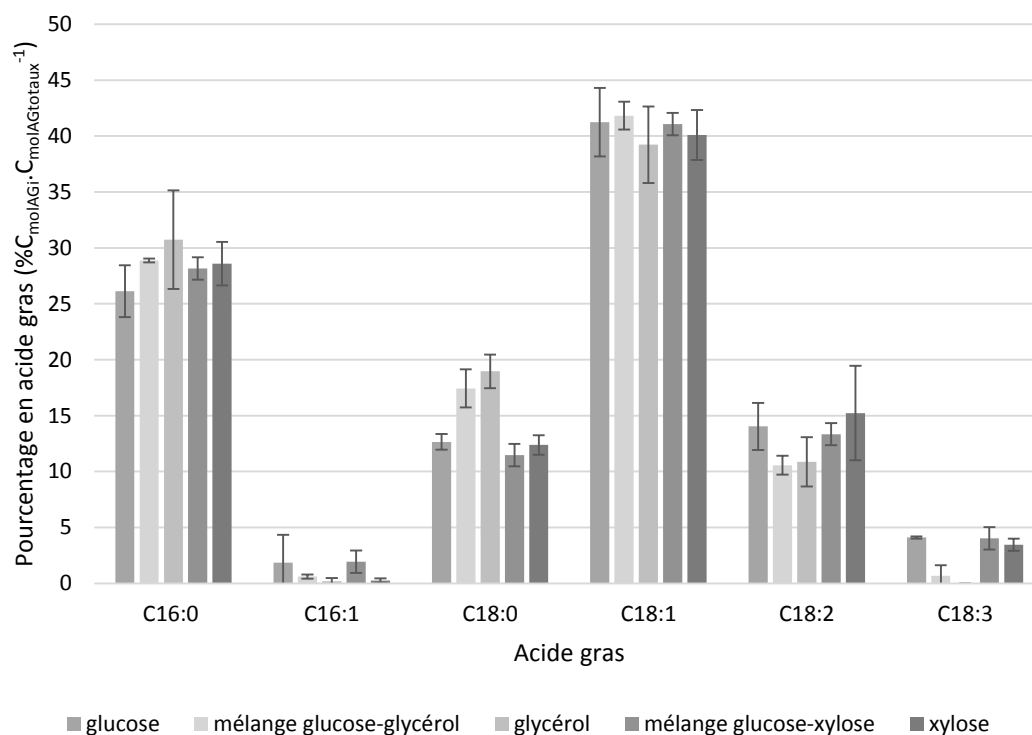


Figure 48 : Profils lipidiques en acides gras totaux obtenus à partir de l'utilisation de différents substrats carbonés lors de cultures de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, limitation azote.

Conclusion

En conclusion, les travaux reportés dans ce chapitre ont permis de quantifier le comportement dynamique de *Rhodotorula glutinis* en condition de production de lipides sur substrats purs et en mélange de glucose, xylose et glycérol. L'objectif est d'améliorer la compréhension de la dynamique de répartition intracellulaire du carbone lors de l'accumulation de substances de réserves (lipides et polysaccharides) chez la souche oléagineuse *Rhodotorula glutinis* par une quantification rationnelle et en conditions contrôlées. Les conduites mises en œuvre ont permis d'obtenir de hautes densités cellulaires jusqu'à $110\text{g}_{\text{cdw}}\cdot\text{L}^{-1}$, lorsque les cinétiques de croissance et d'accumulation de métabolites sont contrôlées par les flux d'apports de substrats et d'azote.

Ces travaux ont permis d'étudier la capacité et les cinétiques de la souche en co-consommation des substrats considérés en s'efforçant, par une gestion en ligne des flux, de tendre vers la détermination en des vitesses spécifiques maximales de consommation du carbone. La démarche originale d'apport graduel en co-substrats a permis de caractériser l'effet du co substrat – glycérol ou xylose- sur l'ensemble des dynamiques physiologiques en bénéficiant de l'acquis cellulaire de la souche en mode fed batch. Les résultats obtenus à partir des sources carbonées xylose et glycérol peuvent être mise en parallèle et comparés aux données de la littérature sur glucose, de manière à dégager similarités et divergence. Ils sont récapitulés dans le Tableau 60.

Tableau 60 : Synthèse des effets de l'utilisation du xylose ou du glycérol en simple ou co-substrats avec le glucose, sur le métabolisme de la souche *Rhodotorula glutinis*.

Phénomène/ Substrat	Glucose-Xylose	Xylose	Glucose-Glycérol	Glycérol	Glucose (Cescut, 2009)
- Cinétiques μ^* (h^{-1}) $q^*_{cTOT} (C_{molsubstrat}.C_{molbiomasse}.h^{-1})$ $q^*_{lip} (C_{molTAG}.C_{molbiomasse}.h^{-1})$	De 20% à 60%	100%	De 30% à 80%	100%	
	0.04 – 0.025	0.009	0.038 – 0.025	0.009	0.01-0.05
	0.22 – 0.14	0.11	0.2 – 0.13	0.11	0.35
	0.065 – 0.03	0.034	0.07 – 0.042	0.03	($q^*_{lip max}$) 0.014
- Rendement $RS,x^* (C_{mol}.C_{mol}^{-1})$ $RS,p (C_{mol}.C_{mol}^{-1})$	0.19 – 0.18	0.07	0.21 – 0.25	0.13	0.01
	0.30-0.24	0.31	0.25- 0.28	0.29	0.42
- Polysaccharides Teneur maximale (% massique)	25%		30%		27%
Devenir	Accumulation continue		Accumulation transitoire puis reconsommation		Accumulation transitoire puis reconsommation
- Teneur finale en lipides (% massique) - Profil lipidique Global	40%		46%		72%
	Centré : C18:1 majoritaire, C16:0 second, C18 :0 et C18 :2 minoritaires, C18 :* et C16 :1 très faibles.		Centré : C18:1 majoritaire, C16:0 second, C18 :0 et C18 :2 minoritaires, C18 :* et C16 :1 très faibles		Centré : C18:1 majoritaire, C16:0 second, C18 :0 et C18 :2 minoritaires, C18 :* et C16 :1 très faibles
Différences	Légère surproduction de C16:0 et C18 :2.		Surproduction de C18 :20		.

Les expériences réalisées permettent de montrer qu'un procédé de culture adapté pour *Rhodotorula glutinis* permet la co-consommation de substrats carbonés et leur utilisation pour accumuler des substances de réserve. Ces fermentations mettent aussi en évidence la capacité de la souche d'intérêt à accumuler des lipides à partir de xylose et de glycérol. Les teneurs de lipides accumulées sont alors respectivement 40 et 46% de la masse sèche, pour un profil lipidique très proche de celui obtenu à partir de glucose. Peu de travaux publiés réalisés dans des conditions expérimentales similaires à celles mises en œuvre lors de cette étude permettent de comparer les résultats. Wiebe *et al.*, ont cependant montré la capacité de *R. toruloides* à accumuler jusqu'à 45% de sa masse sèche à partir de xylose dans un procédé de type batch, pour un N/C de 0.1. Les mêmes auteurs ont mis en évidence la capacité de *R. toruloides* à accumuler jusqu'à 58% de lipides en utilisant comme substrats carbonés un mélange glucose-xylose-arabinose. Même observation quant aux peu de données disponibles sur les capacités d'accumulation de *R. glutinis* à partir de glycérol. Easterling *et al.*, ont reporté un taux d'accumulation de 38% de la masse sèche lors d'un batch ; Saenge *et al.*, ont obtenu jusqu'à 60% d'accumulation massique à partir de glycérol en supplémentant toutefois le milieu de culture avec des surfactants.

Bien que remarquables, les teneurs intracellulaires en lipides à partir de ces substrats alternatifs demeurent inférieures aux 72% obtenus dans un procédé similaire à partir de glucose comme source carbonée. Ces différences de performance trouvent probablement une explication dans les différences stœchiométriques et cinétiques observées entre les différents substrats. En effet, l'ajout progressif de xylose ou de glycérol affecte dans les deux cas la consommation spécifique de carbone et les cinétiques de croissance, alors que les rendements en lipides demeurent corrects- autour de $0.3 \text{ C}_{\text{mol}}.\text{C}_{\text{mol}}^{-1}$ par rapport à $0.42 \text{ C}_{\text{mol}}.\text{C}_{\text{mol}}^{-1}$ sur glucose pur. Par ailleurs, des travaux antérieurs de l'équipe de recherche FAME ont montré l'importance de la croissance résiduelle de la biomasse catalytique, nécessaire au renouvellement de la biomasse, dans le procédé d'accumulation de lipides (Figure 49). Ainsi un μ_{max} de 0.05h^{-1} permettrait une vitesse spécifique d'accumulation maximale. Or, à partir de xylose et de glycérol, les taux de croissances obtenus expérimentalement sont inférieurs à cette valeur. La contrainte cinétique qu'apportent alors les substrats alternatifs au glucose affecte donc les capacités d'accumulation. Toutefois, l'utilisation de substrats purs en fin de fermentation, alors que la part relative de la biomasse catalytique dans la cellule est plus faible et que la teneur en lipides est déjà conséquente, peut impacter négativement les valeurs d'accumulation. Une possibilité raisonnable en termes de procédé industriel serait alors

d'utiliser le xylose ou le glycérol en co-substrat avec le glucose, dans des proportions qui n'affectent pas les cinétiques et la stœchiométrie de manière dramatique. On pourrait proposer les ratios suivants : 30% de glycérol ou 20% de xylose. Dans le cas où ces ratios ne correspondent pas à une matière première disponible ils pourraient être obtenus par complémentation d'une matière naturelle ou d'un effluent agro-industriel avec du glucose.

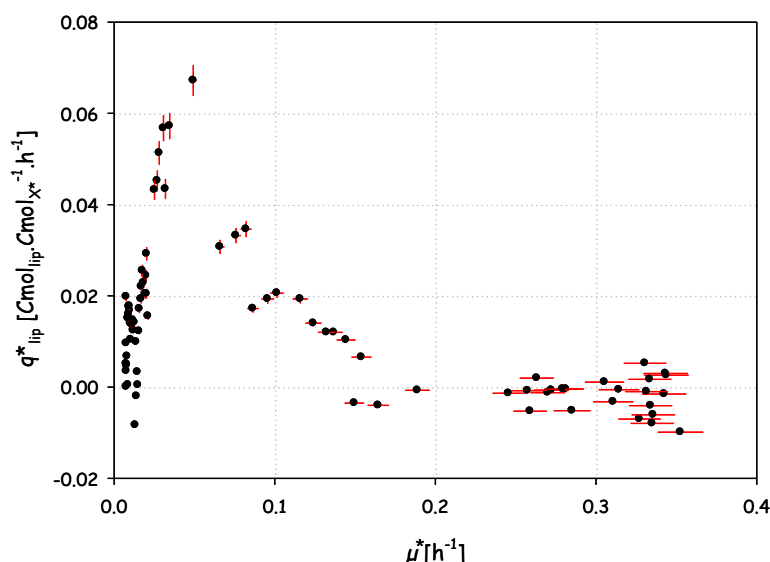


Figure 49: Evolution de la vitesse spécifique réelle d'accumulation de lipides en fonction du taux spécifique de croissance réel lors d'une culture de *R. glutinis* à 30°C, pH 5.5 avec le glucose comme substrat (Cescut, 2009)

L'utilisation de la sonde Fogale, dont le principe repose sur la mesure de la capacitance des cellules biologiques permettant de déterminer les cellules viables, pour un ensemble d'expérimentations révèle des perspectives intéressantes. Ainsi, comme mis en évidence sur la Figure 50, le signal de la sonde biomasse suit parfaitement l'allure de la biomasse totale jusqu'au moment où la limitation en azote est mise en place, on observe alors un décrochement entre la biomasse totale et le signal de la sonde. Par ailleurs, pour les expérimentations réalisées en condition de croissance, le tracé de la biomasse totale -qui correspond pour ces expériences à de la biomasse catalytique- en fonction du signal de la sonde biomasse apparaît linéaire (Figure 51a). Pour les fermentations en condition de limitation azote, le tracé de la biomasse catalytique se corrèle au signal de la sonde (Figure 51b). Il semblerait donc que la sonde biomasse indique le signal de la biomasse catalytique et non de la biomasse totale. Une calibration appropriée de la sonde pourrait indiquer en ligne la biomasse catalytique. De plus, par différence avec la biomasse totale (obtenue soit hors ligne par les analyses d'échantillons soit en ligne par le signal d'un autre type de sonde corrélé à la biomasse totale), il serait possible

de suivre directement le taux d'accumulation lipidique. Cette observation présente des perspectives intéressantes d'un point de vue suivi de procédé dans le cadre d'un développement industriel de production de lipides par fermentation microbienne.

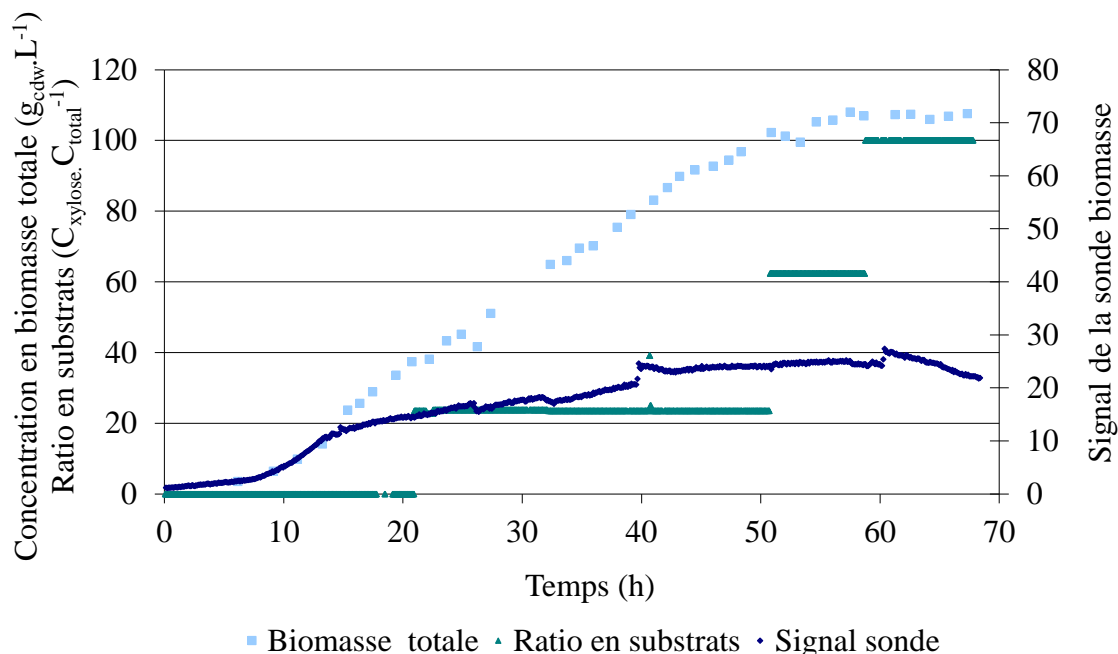


Figure 50 : Biomasse totale, signal de la sonde biomasse et ratios en substrats lors de cultures de *Rhodotorula glutinis*, mode fed-batch, 30°C, pH 5.6, milieu salin, limitation azote, substrats glucose et xylose.

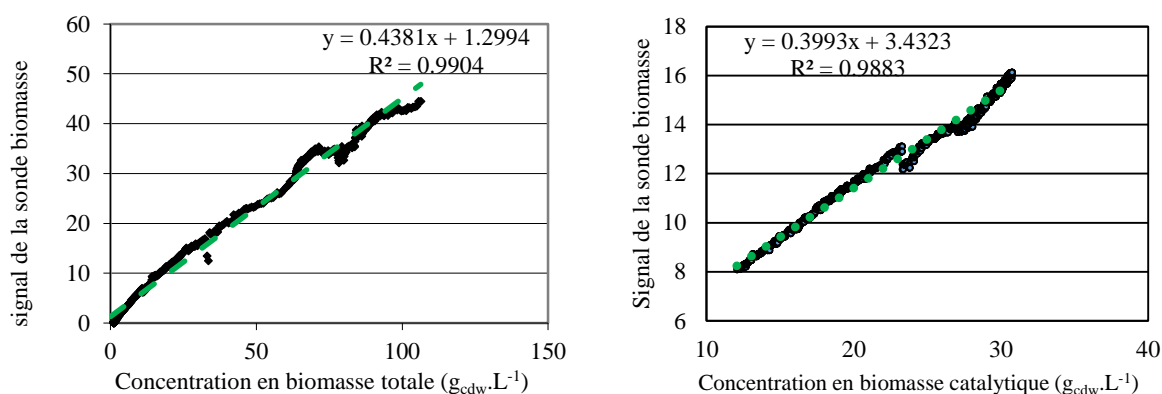


Figure 51 : Corrélation existante entre la biomasse et le signal de la sonde biomasse issues fermentation en mode fed-batch de *Rhodotorula glutinis* à partir de glucose et glycérol comme substrats a) biomasse totale en condition de croissance, b) biomasse catalytique après mise en place de la limitation azote.

Ces expériences soulèvent par ailleurs un certain nombre d'interrogations quant aux points de fonctionnement métabolique de la souche dans les conditions étudiées. Les

contraintes redox et énergétiques imposées par l'assimilation des substrats utilisés doivent en effet s'équilibrer avec les contraintes redox et énergétiques du métabolisme d'accumulation lipidique. Ce dernier a pour principales étapes-clé la synthèse d'acétyl-CoA via l'ATP citrate lyase et la régénération du NADPH puisque pour chaque cycle de synthèse d'un acide gras, deux moles de NADPH sont nécessaires soit pour un acide gras en C18 16 moles de NADPH. Même si la régénération de NADPH chez les organismes oléagineux est aujourd'hui encore à l'étude, l'enzyme malique NADP⁺ dépendant semble être une source importante fournissant le pouvoir réducteur, la seconde source étant la voie des pentoses phosphates, (Ratledge, 2014). Une étude des flux intracellulaires de carbone d'après les résultats expérimentaux permettrait d'évaluer les proportions relatives des flux dans chacune des voies et de déterminer ainsi la principale source de pouvoir réducteur. De plus, alors que la régénération de pouvoir réducteur est au cœur des capacités d'accumulation de TAG, elle détermine aussi la capacité de consommation du xylose : la xylose-réductase NADPH-dépendante convertit ainsi le D-xylose en xylitol qui via la xylose-déshydrogénase NAD⁺ dépendante est transformé en xylulose. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'assimilation du pentose sur la régénération du pouvoir réducteur et sur les flux de carbones impliqués dans la voie des pentoses.

Partie 5 : Conclusion générale et perspectives

Dans un contexte scientifique et industriel où le développement de biocarburants alternatifs aux carburants issus du pétrole est un sujet d'intérêt majeur, les acteurs de l'industrie aéronautique se sont mobilisés pour identifier des substitutions au kérosène. Les spécificités d'un biocarburant aéronautique sont très contraignantes et réduisent donc le champ des molécules candidates. La récente certification des huiles hydrotraitées (en mélange au Jet A1 dans un ratio de 50%) a encouragé le développement de la filière de production de lipides pour une application biokérosène. Les lipides microbiens, et en particulier levuriens, se présentent comme une alternative aux huiles végétales avec de nombreux avantages. Les matières premières mobilisables sont diverses et non compétitives par rapport aux ressources agricoles alimentaires et elles offrent la possibilité d'une production de qualité constante et parfaitement reproductible. En complément, le profil des lipides peut être modulé en fonction des usages, par l'utilisation du micro-organisme, l'ingénierie des souches et les conditions de culture. Enfin la transposition industrielle est facilitée compte tenu des équipements de culture disponibles actuellement au niveau industriel.

Dans un objectif de déploiement industriel d'un procédé de production de lipides par fermentation, le choix des matières premières est primordial. Xylose et glycérol sont des substrats carbonés issus respectivement de la biomasse ligno-cellulosique ou d'effluents industriels. Envisager leur utilisation comme source de carbone pour la mise en œuvre de cultures de micro-organismes oléagineux semble donc être une perspective intéressante.

Il existe une grande diversité de micro-organismes oléagineux parmi lesquels bactéries, champignons, micro-algues et levures. Alors que le profil lipidique accumulé est espèce dépendant, on retrouve des particularités propres à chaque règne, ce qui les rend complémentaires. *R. glutinis* (*R. toruloides*) est une levure oléagineuse d'étude, modèle académique et industriel, bien caractérisée pour ses performances d'accumulation lipidique sur glucose (jusqu'à 70%, Granger, 1992 ; Cescut, 2009) et dont le profil lipidique est centré en C18:1. Connue aussi pour sa couleur rose caractéristique due à la synthèse de caroténoïdes, la souche est reconnue GRAS. Alors que le métabolisme d'accumulation de substances de réserve de la souche a été extensivement étudié sur glucose, peu de publications reportent le potentiel de la souche d'intérêt à partir de xylose et de glycérol comme source carbonée pure, ou en mélange avec le glucose. De l'analyse des travaux antérieurs il a été possible de dégager les verrous scientifiques qui nécessitent une amélioration des connaissances du comportement physiologique de cette levure pour la conversion des substrats cités et de dégager un certain

nombre de problématiques : quelle est la capacité de *R. glutinis* de co-consommer le xylose ou le glycérol avec le glucose ? Quel est le comportement dynamique de *R. glutinis* en termes de cinétiques de croissance et de production de lipides, à partir des substrats d'intérêt purs ou en mélange ? Quels sont les éventuels coproduits et comment s'affranchir de leur production ? Quel est l'impact des substrats sur la nature et la composition des macromolécules accumulées ? Est-il possible de déduire de la connaissance du métabolisme des modes de gestion des flux de carbone et d'azote pour optimiser un procédé de production de lipides à partir de ces substrats ? Dans ce contexte, ce travail a pour objectifs l'étude des potentialités de croissance et d'accumulation lipidique de la levure *R. glutinis* à partir de xylose et de glycérol en simple ou co-substrat avec le glucose.

Les expérimentations menées lors de cette étude ont été mises en œuvre dans un réacteur de 20L parfaitement instrumenté pour la conduite de cultures en mode fed-batch. Dans la première partie, une approche de modélisation prédictive reposant sur des hypothèses métaboliques a été réalisée. Les contraintes considérées sont issues de l'analyse de la littérature et reposent (1) sur le rendement de conversion du carbone en biomasse, (2) sur la synthèse de cofacteurs et plus particulièrement sur l'importance relative des flux impliqués dans les voies métaboliques génératrices de NADPH, H^+ . Cette approche de modélisation prédictive a permis de développer une stratégie de culture originale et adaptée aux problématiques de l'étude : l'apport en co-substrats glucose-glycérol et glucose-xylose s'opère par ratios de carbone successifs avec une teneur en co-substrat croissante au cours de l'expérimentation ($\text{Ratio carbone} = \text{Carbone}_{\text{co-substrat}} / \text{Carbone}_{\text{total apporté}}$).

Les travaux expérimentaux réalisés ont permis de quantifier la croissance de la levure oléagineuse à partir de mélanges binaires - glucose-xylose ou glucose-glycérol- et à partir de constituants purs - glucose, xylose et glycérol – et d'améliorer la connaissance de leur assimilation et de leur devenir. La flexibilité métabolique de la souche a été révélée par sa rapidité d'adaptation au changement de valeurs de ratio (en substrat de l'alimentation en carbone. Le contrôle des flux d'alimentation en sources carbonées a permis la détermination de la vitesse spécifique maximale de consommation du carbone chez *R. glutinis* ; la co-consommation de xylose et de glucose ou de glycérol et de glucose ainsi que l'utilisation de glycérol et de xylose comme substrats purs a été quantifiée. L'utilisation de ces substrats engendre cependant une diminution des rendements et des cinétiques par rapport aux résultats reportés à partir de glucose comme substrat (sur xylose $\mu_{\text{max}} = 0.034 \text{ h}^{-1}$ et $R_{S/X} = 0.028$

$C_{\text{molx}} \cdot C_{\text{molxylose}}^{-1}$; sur glycérol $\mu_{\text{max}}=0.04\text{h}^{-1}$ $R_{\text{S/X}}=0.31C_{\text{molx}} \cdot C_{\text{molglycérol}}^{-1}$). Elle ne semble pas affecter les pools macromoléculaires constitutifs de la biomasse. Plusieurs hypothèses métaboliques ont été proposées pour expliquer les rendements et cinétiques obtenus, par comparaison avec ceux reportés dans la littérature. En particulier, le rapport des flux glycolytiques et issu de la PPP, la mise en place de la néoglucogenèse et la demande en cofacteurs semblent être des points métaboliques-clés. Les navettes mitochondriales présentent un rôle fondamental dans la régénération du NADPH, H^+ .

L'étude du devenir du carbone en conditions d'accumulation lipidique a révélé la capacité de la souche étudiée à utiliser xylose et glycérol en simple ou en co-substrats avec le glucose pour la synthèse de lipides. Les taux massiques maximum en fin de fermentation après avoir appliqué différents ratios sont respectivement 40% de lipides totaux sur glucose-xylose et 46% sur glucose-glycérol. Par comparaison avec les données de la littérature, il apparaît que les cinétiques et rendement demeurent inférieurs à ceux obtenus sur glucose (20%xylose-80%glucose : $q_p=0.065C_{\text{molTAG}} \cdot C_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{\text{S/P}}=0.3C_{\text{moleTAG}} \cdot C_{\text{molesubstrat}}^{-1}$ 100%xylose : $q_p=0.035065C_{\text{molTAG}} \cdot C_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{\text{S/P}}=0.31C_{\text{moleTAG}} \cdot C_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 25% glycérol-75%glucose : $q_p=0.07065C_{\text{molTAG}} \cdot C_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{\text{S/P}}=0.25C_{\text{moleTAG}} \cdot C_{\text{molesubstrat}}^{-1}$, 100% glycérol : $q_p=0.03065C_{\text{molTAG}} \cdot C_{\text{molbiomasse}} \cdot \text{h}^{-1}$, $R_{\text{S/P}}=0.29C_{\text{moleTAG}} \cdot C_{\text{molesubstrat}}^{-1}$).

Il a été mis en évidence que les performances de procédé demeurent intéressantes pour un ratio contenant 20% de cosubstrat et 80% de glucose par rapport aux performances d'accumulations lipidique sur glucose pur. La diversification en substrats carbonés impacte très légèrement le profil lipidique accumulé : il apparaît que le xylose entraîne une surproduction de C16:0 et C18:3et le glycérol favorise l'accumulation de C18:0. Par ailleurs, il a été montré que le signal de la sonde biomasse Fogale corrèle avec la production de biomasse catalytique. Une calibration appropriée et un couplage avec un signal indicateur de la biomasse totale permettrait le suivi en ligne de l'accumulation de molécules de réserve.

Ce travail a permis de dégager plusieurs perspectives intéressantes pour poursuivre l'étude du métabolisme de la souche oléagineuse *Rhodotorula glutinis* à partir de xylose et de glycérol en simple ou co-substrat avec le glucose, en condition de croissance ou d'accumulation lipidique. Comme développé dans la discussion, les résultats obtenus ont permis de proposer des hypothèses quant aux flux intracellulaires de carbone. Si les stœchiométries des voies anaboliques sont généralement connues et quantifiées, il existe

principalement deux grandes inconnues qui sont d'une part, l'énergétique (sous forme d'ATP) requise pour la biosynthèse de macromolécules et de leur assemblage et d'autre part, l'énergétique cellulaire nécessaire au transport des molécules, le maintien des homéostasies cellulaires, l'établissement des gradients, le travail, l'existence de cycles futiles dissipateurs d'énergie (navettes, by-pass métaboliques). Explorer la modélisation métabolique en incluant la compartimentation cellulaire permettrait d'approcher par le calcul les points métaboliques clés supposés et de valider ou infirmer les hypothèses dégagées.

Par ailleurs, pour chaque ratio étudié, que ce soit en condition de croissance ou en limitation azote, les pompes d'alimentation ont été ajustées de manière à ce que l'apport en carbone soit le plus proche possible du potentiel d'assimilation maximal de la souche, tout en évitant la synthèse de coproduits. Dans le cas des fermentations effectuées sous une limitation azote, le flux d'alimentation N/C_{total} est déterminant pour le métabolisme d'accumulation et, en plus du flux de carbone total apporté, doit être optimisé pour favoriser les performances d'accumulation lipidique. La recherche du potentiel maximum en termes de vitesse spécifique de consommation du carbone total et vitesse spécifique de production de lipides pourrait être étudiée à l'aide de culture en mode continu (chémostat). Ainsi, en stabilisant le taux de croissance de la souche par le taux de dilution et l'apport en azote, il serait possible de caractériser la capacité maximale d'assimilation du carbone et de synthèse de macromolécules, de rechercher un N/C optimal tout en explorant un très large panel de ratios de carbone.

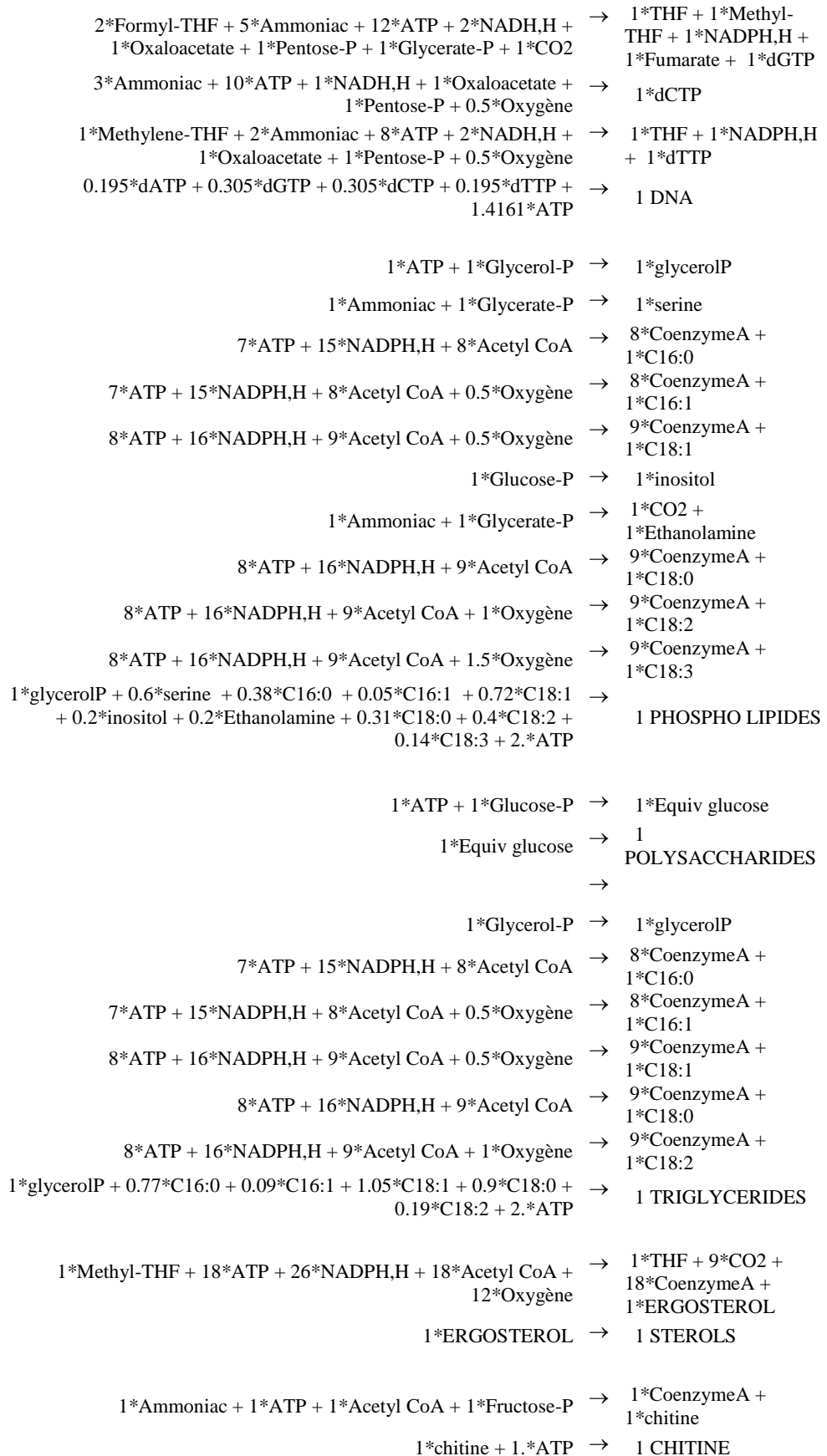
D'un point de vue applicatif, ce travail ouvre des perspectives sur l'utilisation du xylose en mélange au glucose dans des proportions correspondantes aux contenus osidiques des substrats lignocellulosiques (20-30% de xylose, 70-80% de glucose). Il permet également d'envisager dans la filière de production de lipides, le recyclage du glycérol comme substrat, soit issu de la production de biodiesel, soit co-produit de l'hydrolyse des TAG, selon un concept de bioraffinerie intégré où le carbone est recyclé in-situ.

Annexes

Liste des réactions intégrées au descripteur métabolique

ANABOLISME

1*Ammoniac + 1*NADH,H + 1*Pyruvate	→	1*alanine
4*Ammoniac + 5*ATP + 3*NADH,H + 1*NADPH,H + 1*Acetyl CoA + 1*a-cetoglutarate + 1*Oxaloacetate + 1*CO2	→	1*Fumarate + 1*Acetate + 1*CoenzymeA + 1*arginine
1*Ammoniac + 1*NADH,H + 1*Oxaloacetate	→	1*aspartate
1*Ammoniac + 1*NADH,H + 1*a-cetoglutarate	→	1*glutamate
1*THF + 1*Ammoniac + 1*Glycerate-P	→	1*Methylene-THF + 1*glycine
1*Methenyl-THF + 3*Ammoniac + 3*ATP + 1*Oxaloacetate + 1*Pentose-P	→	1*THF + 1*NADH,H + 1*Fumarate + 1*histidine
1*Ammoniac + 2*ATP + 5*NADPH,H + 1*Oxaloacetate + 1*Pyruvate	→	1*CO2 + 1*isoleucine
1*Ammoniac + 1*NADPH,H + 1*Acetyl CoA + 2*Pyruvate	→	2*CO2 + 1*CoenzymeA + 1*leucine
2*Ammoniac + 1*ATP + 2*NADH,H + 2*NADPH,H + 1*Oxaloacetate + 1*Pyruvate + 1*SuccinylCoA	→	1*CO2 + 1*Succinate + 1*CoenzymeA + 1*lysine
1*Methyl-THF + 1*Soufre + 1*Ammoniac + 4*ATP + 3*NADPH,H + 1*Acetyl CoA + 1*Oxaloacetate + 1*Glycerate-P + 1*SuccinylCoA	→	1*THF + 1*Pyruvate + 1*Acetate + 1*Succinate + 2*CoenzymeA + 1*methionine
1*Ammoniac + 1*ATP + 1*NADH,H + 1*NADPH,H + 1*Erythrose-P + 2*P-Enolpyruvate	→	1*CO2 + 1*phenylalanine
1*Ammoniac + 1*ATP + 3*NADPH,H + 1*a-cetoglutarate	→	1*proline
1*Ammoniac + 1*Glycerate-P	→	1*serine
1*Ammoniac + 2*ATP + 2*NADH,H + 1*NADPH,H + 1*Oxaloacetate	→	1*threonine
1*Ammoniac + 1*ATP + 1*NADPH,H + 1*Erythrose-P + 2*P-Enolpyruvate	→	1*CO2 + 1*tyrosine
0.100547293655926*alanine + 4.06458288095529E-02*arginine + 0*asparagine + 9.95175925715699E-02*aspartate + 0*cysteine + 0.119613762014113*glutamate + 0*glutamine + 6.57480735048262E-02*glycine + 1.95924690597389E-02*histidine + 5.20474779158957E-02*isoleucine + 8.55203912224011E-02*leucine + 7.14395258209718E-02*lysine + 7.48779128042503E-03*methionine + 3.94125031254642E-02*phenylalanine + 5.84167120675159E-02*proline + 8.36650745028439E-02*serine + 5.63480836589798E-02*threonine + 0*tryptophane + 3.08874818107521E-02*tyrosine + 4.324*ATP	→	1 PROTEINE
2*Formyl-THF + 5*Ammoniac + 11*ATP + 2*NADH,H + 2*Oxaloacetate + 1*Pentose-P + 1*Glycerate-P + 1*CO2	→	1*THF + 1*Methyl-THF + 2*Fumarate + 1*ATP
2*Formyl-THF + 5*Ammoniac + 12*ATP + 1*Oxaloacetate + 1*Pentose-P + 1*Glycerate-P + 1*CO2	→	1*THF + 1*Methyl-THF + 1*Fumarate + 1*GTP
3*Ammoniac + 10*ATP + 1*Oxaloacetate + 1*Pentose-P + 0.5*Oxygène	→	1*CTP
2*Ammoniac + 7*ATP + 1*NADH,H + 1*Oxaloacetate + 1*Pentose-P + 0.5*Oxygène	→	1*UTP
0.195*ATP + 0.305*GTP + 0.305*CTP + 0.195*UTP + .4*ATP	→	1 RNA
	→	
2*Formyl-THF + 5*Ammoniac + 11*ATP + 4*NADH,H + 2*Oxaloacetate + 1*Pentose-P + 1*Glycerate-P + 1*CO2	→	1*THF + 1*Methyl-THF + 1*NADPH,H + 2*Fumarate + 1*dATP



CATABOLISME

r THF-FTHF	1*THF + 1*NADPH,H + 1*CO2	→	1*Formyl-THF
r myleneTHF-Methyl-THF	1*Methyl-THF	→	1*Methylene-THF + 1*NADPH,H
r myleneTHF-Methenyl-THF	1*Methylene-THF	→	1*Methenyl-THF + 1*NADH,H
r myleneTHF-THF	1*Methylene-THF	→	1*THF + 1*CO2
r gluP	1*ATP + 1*Glucose	→	1*Glucose-P
r F6P	1*Glucose-P	→	1*Fructose-P
r gluconateP	1*Glucose-P	→	1*NADPH,H + 1*Gluconate 6-P
r Fruct-diP	1*ATP + 1*Fructose-P	→	1*Fructose di-P
r trioseP	1*Fructose di-P	→	2*Triose-P
r GlyatediP	1*Triose-P	→	1*NADH,H + 1*Glycerate-diP
r Pga	1*Glycerate-diP	→	1*ATP + 1*Glycerate-P
r PEP	1*Glycerate-P	→	1*P-Enolpyruvate
r acté-AcCoA	2*ATP + 1*Acetate + 1*CoenzymeA	→	1*Acetyl CoA
r pyr	1*P-Enolpyruvate	→	1*ATP + 1*Pyruvate
r pyr-m	1*Pyruvate	→	1*Pyruvate-mito
r AcCoA-m	1*CoenzymeA + 1*Pyruvate-mito	→	1*CO2 + 1*AcetylCoA-mito + 1*NADH,H-mito
r citr	1*AcetylCoA-mito + 1*Oxaloacetate-mito	→	1*CoenzymeA + 1*Citrate-mito
r isocitrate-m	1*Citrate-mito	→	1*Isocitrate-mito
r a-kg-m	1*Isocitrate-mito	→	1*CO2 + 1*NADH,H-mito + 1*a-cetoglutarate-mito
r SucCoA-m	1*CoenzymeA + 1*a-cetoglutarate-mito	→	1*CO2 + 1*SuccinylCoA + 1*NADH,H-mito
r Succina-m	1*SuccinylCoA	→	1*ATP + 1*CoenzymeA + 1*Succinate-mito
r fumarate-m	1*Succinate-mito	→	1*FADH2 + 1*Fumarate-mito
r malate-m	1*Fumarate-mito	→	1*Malate-mito
r OAA-m	1*Malate-mito	→	1*Oxaloacetate-mito + 1*NADH,H-mito
r pep-oaa	1*P-Enolpyruvate + 1*CO2	→	1*Oxaloacetate
r anapl pyr-oaa	1*ATP + 1*CO2 + 1*Pyruvate-mito	→	1*Oxaloacetate-mito
r ribulP HMP	1*Gluconate 6-P	→	1*NADPH,H + 1*Pentose-P + 1*CO2
r riboseP HMP	1*Pentose-P	→	1*Ribose-P
r xyluloseP	1*Pentose-P	→	1*Xylulose-P
r hep HPM	1*Ribose-P + 1*Xylulose-P	→	1*Triose-P + 1*SedoHeptulose-P
r erythrP HMP	1*Triose-P + 1*SedoHeptulose-P	→	1*Erythrose-P + 1*Fructose-P
r trioseP HMP	1*Erythrose-P + 1*Xylulose-P	→	1*Fructose-P + 1*Triose-P
r GlycerolP	1*NADH,H + 1*Triose-P	→	1*Glycerol-P
r 1 O2	0.5*Oxygène + 1*NADH,H-mito	→	8*Proton

r 2 O2	0.5*Oxygène + 1*FADH2	→ 4*Proton
r ATP	3*Proton	→ 1*ATP
r dissip	1*ATP	→
r mal-akg	1*Malate + 1*a-cetoglutarate-mito	→ 1*a-cetoglutarate + 1*Malate-mito
r citr-trsp	1*Malate + 1*Citrate-mito	→ 1*Malate-mito + 1*Citrate
r AcCoA-cyto	1*ATP + 1*CoenzymeA + 1*Citrate	→ 1*Acetyl CoA + 1*Oxaloacetate
r malate-cyto	1*NADH,H + 1*Oxaloacetate	→ 1*Malate
r mal Pyr	1*Malate	→ 1*NADPH,H + 1*Pyruvate + 1*CO2
r trioseP-FAD	1*Glycerol-P	→ 1*Triose-P + 1*FADH2
r AcCoA-car	1*Acetyl CoA	→ 1*AcetylCoA-mito
r fum-mal	1*Fumarate	→ 1*Malate
r Succ-trsp	1*Succinate	→ 1*Succinate-mito
r malate-trsp	1*Malate-mito	→ 1*Malate
r F6P reverse	1*Fructose-P	→ 1*Glucose-P

Abréviations

Abréviations

AAL	Acide α -linoléique
ACS	Acyl-CoA synthétase II
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMP	Adénosine monophosphate
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATP	Adénosine triphosphate
CO ₂	Dioxyde de carbone
CIT	Carbone inorganique total
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DMAPP	Dimethylallyl phosphate
FAD	Flavin adénine dinucléotide
FPP	Farnesyl pyrophosphate
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GPP	Géranyl pyrophosphate
GRAS	Generally regarded as safe
H ₂ O	Eau
HEFA	Hydroprocessed esters and fatty acids
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthyl glutaryl-CoA
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
ICL	Isocitrate lyase
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
K _{L,a}	Coefficient de transfert de l'oxygène
LP	Particules lipidiques
MIP	Major intrinsic proteins
MVA	Acide mévalonique
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
O ₂	Dioxygène
OAA	Oxaloacétate
ORE	Oleate Response Element
pO ₂	Pression partielle en oxygène
PPP	Voie des pentoses phosphate
q _p	Vitesse spécifique de production ou d'accumulation du composé p
QR	Coefficient respiratoire
R _{S,P}	Rendement de conversion global du substrat S en composé P
TAG	Triacylglycérol
TMSH	Trimethylsulphonium hydroxide
X	Biomasse sèche

Abréviations

$Y_{S,P}$	Rendement théorique limite de conversion du substrat S en composé P
μ	Vitesse spécifique de production de biomasse
YPD	Yeast extract peptone dextrose

Indices :

*	hors substances de réserve, catalytique
AG	acides gras
glu	glucose
gly	glycérol
xy	xylose
lip	lipides totaux
S ou Sub	substrat carboné
P	produit (lipides)
X	biomasse sèche

Références bibliographiques

Sites Internet et bibliographie relative à l'introduction sur le contexte des biocarburants aéronautiques

:

1. Aviation civile magazine, n°355, décembre 2010, p10-15, Carburants alternatifs, les efforts s'intensifient
2. Rapport annuel IATA 2014 (International Air Transport Association) 2014 <http://www.iata.org/publications/Pages/annual-review.aspx>.
3. SWAFEA (Sustainable Way for Alternative Fuels and Energy in Aviation), State of the art on alternative fuels in aviation – executive summary, April 2010, www.swafea.eu
4. Rapport annuel IATA 2013 alternative fuel report <http://www.iata.org/publications/documents/2013-report-alternative-fuels.pdf>
5. <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Historique-du-cours-du-Brent-date.html>
6. Panorama 2015, présentation d'Olivier Appert <http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Actualites/Evenements/Nous-organisons/Panorama-2015>
7. Informations sur Flight Path http://ec.europa.eu/energy/renewables/biofuels/flight_path_fr.htm

Articles scientifiques :

Alfeel, W., Wakil, S. J., and Chirala, S. S. (1993). The FAS3 gene coding for acetyl-coA carboxylase is essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Faseb Journal* (7):7:1229-1229.

Alvarez, H. M., Pucci, O.H., Steinbüchel, A. (1997). Lipid storage compounds in marine bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 132–139.

Alvarez, H. M., and Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:367–376.

Anastassiadis, S., and Rehm, H. J. (2005). Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *Electronic Journal Of Biotechnology* 8(2): 146-161.

Athenstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A., Kohlwein, S.D., and Daum, G. (1997). Identification and Characterization of Major Lipid Particle Proteins of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 181(20):6441.

- Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., and Zhao, M., (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology* 6:2130-2134.
- Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M.-T., Hapala, I., Papanikolaou, S., Chardot, T., Nicaud, J.-M. (2008). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied And Environmental Microbiology* 74(24): 7779-7789.
- Berthe, M.C., Charpentier, C., Lematre, J., Bonaly, R. (1981). Glucosamine and chitin accumulation in cell walls of the yeast *Rhodotorula glutinis* CBS 3044. Influence of culture conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 100(4):1504-14.
- Benson, B. B., and Krause, D. Jr. (1984). The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater in equilibrium with the atmosphere. *Limnology and Oceanography* 29(3):620-632.
- Bill, R.M., Hedfalk, K., Karlgren, S., Mullins, J.G.L., Rydström, J. and Hohmann, S. (2001). Analysis of the pore of the unusual major intrinsic protein channel, yeast Fps1p. *Journal of Biological Chemistry* 276:36543-36549.
- Bocharova, N.N., Chernysh, V.G., Palagina, N.K. (1975). Effect of nitrogen and phosphorus in the medium on the level of reserve carbohydrates in the cells of a dividing baker's yeast culture. *Mikrobiologiya* 44(5):832-838.
- Botham, P. A. and Ratledge, C (1979). A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida* 107 and Other Oleaginous Micro-organisms. *Microbiology* 114(2): 361-375
- Boulton, C. A. and Ratledge C. (1981). Correlation Of Lipid-Accumulation In Yeasts With Possession Of Atp-Citrate Lyase. *Journal Of General Microbiology* 127: 169-176.
- Boulton, C. A., and Ratledge, C. (1984). The physiology of hydrocarbon utilizing microorganisms. *Topics in Fermentation and Enzyme Technology* (9).
- Boulton, C. A., and Ratledge, C. in *Comprehensive Biotechnology* (M. Moo-Young, gen. ed.), Vol. 1 (H. Dalton, ed.), Pergamon, Oxford (1985), 459-482. 7.
- Briffaud, J., and Engasser, M. (1979). Citric acid production from glucose. I. Growth and excretion kinetics in a stirred fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 21(11):2082-2092.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J., Miller, K.A. (1996). Effects of harvested stage et light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 32:64-73.
- Buzzini, P., and Martini, A. (1999) Production of Carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* Cultured in Raw Materials of Agro-Industrial Origin. *Bioresource Technology*, 71(1):41-44.

- Buzzini, P.(2001) Batch and Fed-Batch Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* Co-Cultures in Corn Syrup. *Journal of Applied Microbiology* 90(5):843-847.
- Cadoret, J.P., and Bernard, O. (2008). Lipid biofuel production with microalgae: potential and challenges. *Journal de la Société de biologie* 202(3):201-211.
- Cescut, J. (2009). Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés. *Génie Biochimique et Alimentaire*. Toulouse, INSA: 301.
- Cescut, J., Fillaudeau, L., Molina-Jouve, C., and Uribe Larrea, J.-L. (2014). Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnology for Biofuels* 7:164.
- Chen, X., Li, Z., Zhang, X., Hu, F., Ryu, D.D.Y., and Bao, J. (2009). Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 159:591-604.
- Chirala, S. S. (1992). Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:10232–10236.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294–306.
- Cohen, G., Fessl, F., Traczyk, A., Rytka, J., and Ruis, J. (1985). Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Molecular Genetics and Genomics* 200:74-79.
- Cohen, G., Rapatz, W., Ruis, H. (1988). Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *European Journal of Biochemistry*. 176:159-163.
- Cortassa S., Aon, J. C., and Aon, M. A. (1995). Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering* 47(2):193-208.
- Czabany, T., Athenstaedt, K., and Daum, G. (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771:299–309.
- D'Cunha, G.B., Satyanarayan, V., and Madhusudanan Nair, P. (1996), Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* 42(1):17-20.
- Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., and Zhao, M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology* 6:2130-2134.

- Davies, R. J., Holdsworth, J. E. and Reader, S. L. (1990). The Effect Of Low Oxygen-Uptake Rate On The Fatty-Acid Profile Of The Oleaginous Yeast *Apiotrichum-Curvatum*. Applied Microbiology And Biotechnology 33(5):569-573.
- Dittrich, F., D., Zajonc, Hühne, K., Hoja, U., Ekici, A., Greiner, E., Klein, H., Hofmann, J., Bessoule, J.J., Sperling, P., and Schweizer, E. (1998). Fatty acid elongation in yeast - Biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. European Journal Of Biochemistry 252(3):477-485.
- Easterling, E.R., French, W.T., Hernandez, R., and Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. Bioresource technology 100(1):356-361.
- Einerhand, A. W. C., Kos, W. T., Distel, B. and Tabak, H. F. (1993). Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. European Journal Of Biochemistry 214(1):323-331.
- Erdei, B., Frankó, B., Galbe, M., Zacchi, G. (2013) Glucose and xylose co-fermentation of pretreated wheat straw using mutants of *S. cerevisiae* TMB3400. Journal of Biotechnology. 164(1):50-58.
- Evans, C. T., Scragg, A. H., and Ratledge, C. (1983). A Comparative-study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts. European Journal Of Biochemistry 130(1):195-204.
- Evans, C. T. and Ratledge, C. (1984). Phosphofructokinase and the Regulation of the Flux of Carbon from Glucose to Lipid in the Oleaginous Yeast *Rhodospiridium toruloides*. Journal of General Microbiology 130:3251-3264.
- Evans, C. T. and C. Ratledge (1985). The Physiological Significance Of Citric-Acid In The Control Of Metabolism In Lipid-Accumulating Yeasts. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 3: 349-375.
- Ferrante, G., and Kates, M. (1983). Pathways for the desaturation of oloyl chains in *Candida curvata*." Can. J. Biochem. Cell. Biol. 61(1): 191-1123
- Fillaudeau, L., Cescut, J., Anne-Archard, D., Nicaud, J.M., Uribelarrea, J.-L., Molina-Jouve, C. (2009). Morphology and rheological behaviour of *Yarrowia lipolytica* during production of intra-cellular energetic molecules: impact of lipid accumulation and genetic modifications. In: 8th World Congress of Chemical Engineering, WCCE8, August 23-27, 2009, Montréal, Canada.
- Freer, S.N., Skory, C. D., and Bothast, R. J. (1997). D-Xylose metabolism in *Rhodospiridium toruloides*. Biotechnology Letters 19:1119.

- Fyferling, M. (2007). Transfert d'oxygène en condition de culture microbienne intensive. Génie Biochimique et Alimentaire. Toulouse, INSA: 244.
- Gabier, A. C., Gourdon, P., Reitz, J., Leveau, J.Y., Bouix, M. (2005). Intracellular physiological events of yeast *Rhodotorula glutinis* during storage at +4 degrees C. Int J Food Microbiol. 105(2):97-109
- Gárdonyi, M., Österberg, M., Rodrigues, C., Spencer-Martins, I., and Hahn-Hägerdal, B., (2003). High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. FEMS Yeast Research 3(1):45-52.
- Goodridge, A. G. (1991). Fatty acid synthesis in eucaryotes. New York, Elsevier Science Publishers.
- Granger, L. M. (1992). Caractérisation cinétique et stœchiométrique de la synthèse d'acides gras chez *Rhodotorula glutinis*. Génie Biochimique et Alimentaire. Toulouse, INSA: 247.
- Granger, L. M., Perlot, P., Goma, G., and Pareilleux, A. (1993). Effect of various nutrient limitations on fatty-acid production by *Rhodotorula-glutinis*. Applied Microbiology And Biotechnology 38(6):784-789.
- Granger, L. M., Perlot, P., Goma, G., and Pareilleux, A. (1993). Efficiency of fatty-acid synthesis by oleaginous yeasts - prediction of yield and fatty-acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. Biotechnology And Bioengineering 42(10):1151-1156.
- Grotkjaer, T, Christakopoulos, P., Nielsen, J., Olsson, L. (2005). Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. Metabolic Engineering 7(5-6):437-44.
- Gurpilhares, D. B., Hasmann, F. A., Pessoa, A. Jr, Roberto, I. C. (2009). The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 36(1):87-93.
- Habison, A., Kubicek, C.P., and Röhr, M. (1979). Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid producing *Aspergillus niger*. FEMS Microbiology Letters 5(1): 39-42.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M., and Gorwa-Grauslund, M., (2007). Metabolic Engineering for Pentose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*, in Biofuels, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 108:147-177
- Hall, M. J., and Ratledge, C. et al. (1977). Lipid-Accumulation In An Oleaginous Yeast (*Candida* 107) Growing On Glucose In Single-Stage Continuous Culture. Applied And Environmental Microbiology 33(3):577-584.

- Hansson, L., Dostalek, M. (1986). Effect Of Culture Conditions On Fatty-Acid Composition In Lipids Produced By The Yeast *Cryptococcus-Albidus Var Albidus*. Journal Of The American Oil Chemists Society 63(9):1179-1184.
- Hassan, M., Blanc, P. J., Granger, L. M., Pareilleux, A., and Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch. Process Biochemistry 31(4):355.
- Hernandez-Almanzaa, A., Montaneza, J.C., Aguilar-Gonzalez, M. A., Martinez-Avilac, C., Rodriguez-Herreraa, R., Aguilara, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. Food Bioscience 5:64-72.
- Hiltbrunner, K., and Zizek, C. (2006). Importance of CO₂ measurement as a control parameter in bioprocesses: new electrochemical measurement system for in-situ CO₂ measurement, in Current Topics on Bioprocesses in Food Industry, First International Congress on Bioprocesses in Food Industries, held at Clermont-Ferrand during 11-13 July 2004. Editors: Prof. Christian Larroche, Prof. Ashok Pandey and Prof. Claude-Gilles Dussap, 2006, Edition, Place & Publisher :1st Ed. Delhi, Asiatech Publishers, Inc.
- Hiltunen, J. K., Filppula, S.A., Hayrinen, H.M., Koivuranta, K.T., Hakkola, E.H., (1993). Peroxisomal Beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids. Biochimie 75: 175-182.
- Höfer, M., Becker, J.U., Brand, K., Deckner, K., and Betz, A. (1969). A study of the enzyme equipment of the yeast *Rhodotorula gracilis*, FEBS Letters 3(5):322-324.
- Holloway, P. W., Katz, J.T. (1972). A requirement for cytochrome b5 in microsomal stearyl coenzyme A desaturation. Biochemistry 11:689-3695.
- Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C., Kielland-Brandt, M.C. (2000). GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 37(1):108-24.
- Igual, J. C., Gonzalezbosch, C., Franco L., and Perezortin J. E. (1992). The POT1 gene for yeast peroxisomal thiolase is subject to 3 different mechanisms of regulation. Molecular Microbiology 6(14):1867-1875.
- Jeffries, T.W., and Jin, Y.-S. (2004). Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology 63:495-509.
- Jeffries, T.W., (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. Current Opinion in Biotechnology 17(3):320-326.

- Jenni, S., Leibundgut, M., Boehringer, D., Frick, C., Mikolásek, B., Ban, N. (2007). Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling. *Science* 316(5822):254-261.
- Jeon, Y.J., Shin, H.S., Rogers, P.L (2011). Xylitol production from a mutant strain of *Candida tropicalis*. *Letters in Applied Microbiology* 53(1):106-13.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V. S., Sista, V. R., Yadav, N. K. (1992). Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast : *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8(4):382-384.
- Karpichev, I. V., and Small, G. M. (1998). Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* 18(11):6560-6570.
- Kilian, S.G. and Uden, N. (1988). Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipites*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27:545-248.
- Kötter, P. and Ciriacy, M. (1993), Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38(6):776-783.
- Kubicek, C. P., Röhr, M. (1980). Regulation of citrate synthase from the citric acid accumulating fungus, *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 615(2):449-457.
- Larpent, J.P., *Biotechnologie des levures*, Paris, 1991, Masson. pp.
- Latruffe, N., Malki, M. C., Nicolas-Frances, V., Jannin, B., Clemencet, M. C., Hansmannel, F., Passilly-Degrace, P., and Berlot, J. P. (2001). Peroxisome-proliferator-activated receptors as physiological sensors of fatty acid metabolism : molecular regulation in peroxisomes. *Biochemical Society Transactions* 29:305-309.
- Li, Q.; Liang, L., Xue, F., Zhang, X.; Tan, T. (2010), The Utilization of Xylose by Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis*, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 4(1):53-57.
- Lillie, S.H., and Pringle, J.R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of Bacteriology* 143:1384-1394.
- Luo, Y. S., Nicaud, J. M., Van Veldhoven, P. P., Chardot, T. (2002). The acyl-CoA oxidases from the yeast *Yarrowia lipolytica*: characterization of Aox2p. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 407(1):32.
- Luyten K, A., J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein J. M. and Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO Journal* 14(7):1360-1371.

- Mc Donough, V. M., Stukey, J. E., and Martin, C. E. (1991). Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *Journal Of Biological Chemistry* 267(9):5931-5936.
- Mares, D., (1982). Ultrastructural and cytochemical study of *Rhodotorula glutinis*; in the main growth phases. *Mycopathologia* 80(3):179-188.
- Marr, N. Foglia, J., Terebiznik, M., Athenstaedt, K. and Zaremborg, V. (2012) Controlling lipid fluxes at glycerol-3-phosphate acyltransferase step in yeast. Unique contribution of *gat1p* to oleic acid-induced lipid particle formation. *Journal Of Biological Chemistry* 287(13):10251–10264.
- Martínez, C., Gertosio, C., Labbe, A., Pérez, R., Ganga, M. A (2006). Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(4).
- Mast, B., Zöhrens, N., Schmidl, F., Hernandez, R., Todd French, W., Merkt, N., Claupein, W., Graeff-Hönninger, S. 2014. Lipid production for microbial biodiesel by the oleagenous yeast *rhodotorula glutinis* using hydrolysates of wheat straw and miscanthus as carbon sources. *Waste and biomass valorization* 5 (6), 955-962.
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A. and Aguilar, C. N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* 13:12.
- Moresi, M. (1994). Effect Of Glucose-Concentration On Citric-Acid Production By *Yarrowia Lipolytica*. *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology* 60(4):387-395.
- Moreton, R. S. (1985). Modification of fatty-acid composition of lipid accumulating yeasts with cyclopropene fatty-acid desaturase inhibitors. *Applied Microbiology And Biotechnology* 22(1):41-45.
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., Sokolov, A. P. and Finogenova, T. V. (2004). The isolation, purification, and some properties of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase from the organic acid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*, *Microbiology* 73(3):249-254.
- Navarro, B. and Igual, J. C. (1994) ADR1 and SNF1 mediate different mechanisms in transcriptional regulation of yeast POT1 gene. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 202(2):960-966.
- Neves, M.L.V.d., (2004) Glycerol transport in yeasts: physiological, molecular and phylogenetic approaches, Braga, Univerité de Minho:140.
- Nicaud, J. M., Le Clainche, A., Le Dall, M.T., Wang, H., Gaillardin, C. (1998). *Yarrowia lipolytica*, a yeast model for the genetic studies of hydroxy fatty acids biotransformation into lactones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5(1-4):175.

Oliveira, R., Lages, F., Silva-Graça, M. and Lucas, C. (2003). Fps1p channel is the mediator of the major part of the glycerol passive diffusion: artefacts and redefinitions. *Biochim. Biophys. Acta* 1613:57-71.

Oloke, J.K., and Glick, B.R. (2006). Expression of melanin and insecticidal protein from *Rhodotorula glutinis* in *Escherichia coli*, *African Journal of Biotechnology* 5:327-332.

Pitkänen, J. -P., Aristidou, A., Salusjarvi, L., Ruohonen, L., and Penttilä, M. (2003). Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. *Metabolic Engineering* 5(1):16–31.

Portelli, B. (2011). Biologie systémique et intégrative pour l'amélioration de l'accumulation et de la sélectivité des acides gras accumulés dans les espèces levuriennes. *Génie Biochimique et Alimentaire*. Toulouse, INSA: 212.

Pruvost, J., Van vooren, G., Cogne, G., Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource technology*, 100:5988-5995.

Pruvost, J., Van vooren, G., Le gouic, B., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J. (2011). Systematic investigation of biomass and lipids productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource Technology* 102:150-158.

Ratledge, C. (1987). Lipid Biotechnology - A Wonderland For The Microbial Physiologist. *Journal Of The American Oil Chemists Society* 64(12):1647-1656.

Ratledge, C., and Wilkinson, S. G. (1988). *Microbial Lipids*. London, Harcourt Brace Jovanovich.

Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions* 30:1047-1050.

Ratledge, C., and Wynn, J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganism. *Advances in applied microbiology* 51.

Ratledge, C. (2014). The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms : a reappraisal and unsolved problems, *Biotechnology letters* 36(8):1557-1568.

Rattray, J. B., Schibeci, A., and Kidby, D.K. (1975). Lipids of yeast. *Bacteriological Reviews* 39:197–231.

Remize, F., Andrieu, E., Dequin, S. (2000). Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg^{2+} and mitochondrial K^{+} acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3151-3159.

- Rottensteiner, H., Kal, A. J., Filipits, M., Binder, M., Hamilton, B., Tabak, H. F., and Ruis, H. (1996). Pip2p: A transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Embo Journal* 15(12):2924-2934.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T.T., and Bourtoom, T., (2010). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* 46(1):210-218.
- Salusjärvi, L., Kankainen, M., Soliymani, R., Pitkänen, J.-P., Penttilä, M., and Ruohonen, L. (2008). Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology* 7(18).
- Savy, S. (2005). Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques (Des carotènes aux xanthophylles). Université de Bretagne occidentale –Brest :179.
- Saxena, V., Sharma, C. D., Bhagat, S. D., Saini, V. S., and Adhikari, D. K. (1998). Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Journal Of The American Oil Chemists Society* 75(4): 501-505.
- Schröter, A. and Kopperschlager, G. (1996). 6-Phosphofructo-1-kinase from the lipid-accumulating, non-fermentative, red yeast *Rhodotorula glutinis*. *FEMS Microbiology Letters* 142(2-3):247-252.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program - biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development.
- Shinde, R., Mantur, B., Patil, G., Parande, M., and Parande, A., (2008). Meningitis due to *Rhodotorula Glutinis* in an HIV infected patient, *Indian Journal of Medical Microbiology* 26:375-397.
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R., Ladisch, M. R. (1985). Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnology Letters* 7(6):431-436.
- Sorger, D., and Daum, G. (2002). Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 184:519–524.
- Stambuk, B.U., Franden, M. A., Singh, A., and Zhang, M., (2003). D-Xylose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 108:255-63.
- Stukey, J. E., McDonough, V. M., Martin, C.E. (1989). Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 264:16537-16544.

- Stukey, J. E., McDonough, V. M., Martin, C.E. (1990). "The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *Journal of Biological Chemistry*. 265:20144-20149.
- Subtil and Boles (2012). Competition between pentose and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for biofuels* 5(4).
- Suomalainen, I., Londesborough, J., and Korhola, M., (1989). An Oxidoreductive Pathway for D-Xylose Assimilation by *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of General Microbiology* 135:1537-1545.
- Sutherland, F.C.W., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A. and Killian, G. (1997). Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 179:7790-7795.
- Suutari, M., Linkkonen, K., and Laakso, S. (1990). Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *Journal General Microbiology* 136:1469–1474.
- Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (101)3:223-226.
- Tehlivets, O., K. Scheuringer, et Kohlwein, C.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular And Cell Biology Of Lipids* 1771(3): 255-270.
- Titorenko, V. I., Nicaud, J. M., Wang, H. J., Chan, H., and Rachubinski, R. A. (2002). Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *Journal Of Cell Biology* 156(3):481-494.
- Vance, D. E. and J. Vance (1991). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Van de Vondervoort, P. J., de Groot, M.J., Ruijter, G.J., Visser, J. (2006). Selection and characterisation of a xylitol-derepressed *Aspergillus niger* mutant that is apparently impaired in xylitol transport. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(4):881-886.
- Van Roermund, C. W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R. J., and Tabak, H. F. (1995). The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions." *EMBO Journal* 14:3480-3486.

- Van Vooren, G., Le grand, F., Legrand, J., Cuine, S., Peltier, G., Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology* 124:421-432.
- Wakil, S. J., Stoops, J.K., and Joshi, V. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry* 52:537–579.
- Wang, T. W., Luo, Y., and Small, G. M., (1994) The POX1 gene encoding peroxisomal acyl-CoA oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* is under the control of multiple regulatory elements. *Journal Of Biological Chemistry* 269(39):24480-24485.
- Wang, H. J. J., Le Dall, M. T., Wache, Y., Laroche, C., Belin, J. M., Gaillardin, C., and Nicaud, J. M. (1999). Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal Of Bacteriology* 181(17):5140-5148.
- Wiebe, M.G., Koivuranta, K., Penttilä, M., Ruohonen L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnol.* 30;12:26.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 24(3):471-84.
- Xu, H., Miao, X. L., Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* 126:499-507.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Nakamichi, K., and Chibata, I., (1981). Production of l-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 42:773-778.
- Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Bai, F., Zhao, Z. K. (2014). Recycling microbial lipid production wastes to cultivate oleaginous yeasts. *Bioresource Technology* 175:91-96.
- Yang, X., Jinb, G., Gong, Z., Shenb, H., Bai, F., and Kent Zhao, Z. (2014) Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochemical Engineering Journal* 91:86–91.
- Yen, H. W., Yang, Y.C., Yu, Y.H. (2012). Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114(4):453-456.
- Yokoshi, T., Honda, D., Higashihara, T., and Nakatara, T (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:72-76.

Zhang, Y., Adams, I.P., Ratledge, C. (2007) Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5 fold increase in lipid accumulation. Microbiology 153:2013–2025.

Zhang, G., Todd French, W., Hernandez, R., Alley, E., Paraschivescu, M. (2011). Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. Biomass and Bioenergy 35(1):734-740.

Zikou, E., Chatzifragkou, A., Koutinas, A. A., Papanikolaou, S. (2013). Evaluating glucose and xylose as co-substrates for lipid accumulation and γ -linolenic acid biosynthesis of *Thamnidium elegans*. Journal of Applied Microbiology 114(4):1020-1032.

Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H., Zhao, Z.K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. Nature Communications 3:1112.

